



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM
POLIMORFISMOS DOS GENES CODIFICANTES DO RECEPTOR DA
VITAMINA D (VDR) E ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO G (HLA-G)

THIAGO SOTERO FRAGOSO

RECIFE
2014

**LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM
POLIMORFISMOS DOS GENES CODIFICANTE DO RECEPTOR DA VITAMINA D
(VDR) E ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO G (HLA-G)**

THIAGO SOTERO FRAGOSO

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde
do Laboratório de Imunopatologia Keizo
Asami, Universidade Federal de Pernambuco,
como parte dos requisitos para obtenção
do grau de Doutor em Biologia Aplicada à
Saúde.**

**ORIENTADOR: PROF. DR. SERGIO CROVELLA
COORIENTADORA: PROF. DRA. PAULA SANDRIN-GARCIA**

**RECIFE
2014**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Fragoso, Thiago Sotero

Lupus Eritematoso Sistêmico e sua associação com polimorfismos dos genes codificante do receptor da vitamina D (VDR) e antígeno leucocitário humano G (HLA-G) / Thiago Sotero Fragoso. – Recife: O Autor, 2014.

132 folhas: il.

Orientador: Sergio Crovella

Coorientadora: Paula Sandrin-Garcia

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. Doenças autoimunes 2. Lúpus Eritematoso Sistêmico I. Crovella, Sergio (orient.) II. Sandrin-Garcia, Paula (Coorient.) III. Título.

616.772

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-109

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISAS E
PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO LABORATÓRIO DE
IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

Prof. Dr. José Luís Lima Filho

COORDENAÇÃO ADMINISTRATIVA DO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO
ASAMI

Rosângela Ferreira Frade de Araújo

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: FRAGOSO, Thiago Sotero

Título: Lúpus Eritematoso Sistêmico e sua associação com polimorfismos dos genes codificantes do Receptor da Vitamina D (VDR) e Antígeno Leucocitário Humano (HLA-G).

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 27/03/2014

Banca Examinadora

Prof. Dra. Paula Sandrin-Garcia

Departamento de Genética – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Departamento de Patologia – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo Júnior

Departamento de Patologia – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Nadja Maria Jorge Asano

Departamento de Medicina Clínica – Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão

Departamento de Patologia – Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

A Nossa Senhora Aparecida, minha protetora e guia;

Aos meus primeiros mestres, meus pais;

A Juliana, pois sem ela não teria conseguido terminar esta caminhada;

Aos meus sobrinhos Davi, Arthur, Laís e Marina, fontes de novas
e boas energias na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, pela proteção e por me guiar desde sempre nos momentos difíceis da minha vida;

Aos meus pais, que foram os meus primeiros mestres nesta vida;

Ao meu irmão Wagner, por sempre me mostrar que sonhar é necessário, realizar os sonhos é mais do que possível, e não desistir deles é o principal meio através do qual iremos realizá-los;

A minha irmã Samya, parte fundamental do meu alicerce familiar;

A minha esposa Juliana, pois sem ela não teria tido forças suficientes para ter chegado até aqui;

A meu sogro Luís, minha sogra Rossana Sette, minha cunhada Daniela e concunhado Carlos, meus alicerces em Pernambuco;

Ao meu orientador Professor Dr. Sérgio Crovella e a minha co-orientadora Professora Dra. Paula Sandrin-Garcia pela imensurável ajuda;

Aos pacientes, pois doaram parte do seu tempo e de si mesmos em nome da ciência e da pesquisa;

A todos que contribuíram direta e indiretamente para realização de todo o estudo.

*"Crescer custa, demora, esfolta, mas compensa.
É uma vitória secreta, sem testemunhas.
O adversário somos nós mesmos."*

Martha Medeiros

RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune multissistêmica. Fatores genéticos podem aumentar o risco de desenvolver o LES, contribuindo com a quebra da auto-tolerância e desenvolvimento de autoanticorpos patogênicos. Vários genes já foram associados à susceptibilidade ao LES, entre eles os que codificam o Antígeno Leucocitário Humano e as proteínas envolvidas na imunomodulação. Recentemente, o papel imunorregulador da vitamina D, realizado através da sua ligação com seu receptor (*VDR*) tem ganhado destaque. Outrossim, o Antígeno Leucocitário Humano G (*HLA-G*) tem demonstrado importante função no mecanismo de tolerância imunológica. Sendo assim, a hipótese deste trabalho é de que polimorfismos genéticos do *VDR* e *HLA-G* estejam associados à susceptibilidade ao desenvolvimento de manifestações clínicas no LES. Neste sentido, foram desenvolvidos três estudos de caso-controle envolvendo 128 pacientes com LES de Recife/PE e 158 de Ribeirão Preto/SP. Cinco TagSNPs para o gene *VDR* e 25 SNPs do gene *HLA-G* foram avaliados através de genotipagem, além de uma meta-análise envolvendo a inserção/deleção (ins/del) de 14pb do *HLA-G*. Foi verificada associação com a susceptibilidade ao LES, na população do Recife/PE, com os SNPS rs11168268 e rs2248098 do *VDR*, e com o SNP rs1707 do *HLA-G*. Ainda, o haplótipo TCGITCCCGAG do *HLA-G* foi associado ao desenvolvimento do LES. Em relação às manifestações clínicas, 3 dos 5 SNPs testados para o *VDR* (rs11168268, rs2248098 e rs1540339) foram associados ao risco de desenvolvimento de nefrite na população de Recife/PE. Na população de Ribeirão Preto-SP foram observadas associações com alterações cutâneas (rs11168268), alterações imunológicas (rs2248098), artrite (rs3890733) e produção de anticorpos anti-DNA (rs4760648). Em relação ao *HLA-G*, estudado na população de Recife/PE, foram observadas associações com lesões cutâneas (-725 C>G>T), alterações imunológicas (-400 G>A e -391 G>A), manifestações hematológicas (alelo mutante em homozigose na posição -762 C>T) e artrite (insG540). A meta-análise demonstrou associação do LES com a inserção/deleção de 14pb do gene *HLA-G*. Dessa forma, no presente trabalho podemos concluir que os genes *HLA-G* e *VDR* estavam associados ao LES e/ou às suas manifestações clínicas nas populações estudadas, podendo influenciar no desenvolvimento da doença.

Palavras-chave: Lúpus eritematoso Sistêmico, Receptor da vitamina D e Antígeno Leucocitário Humano G.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multisystem autoimmune disease. Genetic factors may increase the risk of developing SLE, contributing to the breakdown of self-tolerance and development of pathogenic autoantibodies. Several genes have been associated with susceptibility to SLE, including those which encode the human leukocyte antigen and proteins involved in immunomodulation. Recently, the immunoregulatory role of vitamin D performed by binding to its receptor (VDR) has gained prominence. Furthermore, the Human Leukocyte Antigen G (HLA-G) have demonstrated an important role in immune tolerance mechanism. Thus, the hypothesis is that genetic polymorphisms of *VDR* and *HLA-G* are associated with susceptibility to SLE and development of its clinical manifestations. In this sense, three case-control studies involving 128 patients with SLE from Recife-PE and 158 of Ribeirão Preto-SP were developed. Five TagSNPs for the *VDR* gene and 25 SNPs in the *HLA-G* gene were evaluated by genotyping, and a meta-analysis involving the insertion/deletion (ins/del) 14pb of *HLA-G* was performed. Association with susceptibility to SLE in Recife-PE population was detected with rs11168268 and rs2248098 of *VDR*, and the SNP rs1707 of *HLA-G*. In addition, the *HLA-G* haplotype TCGITCCCGAG was associated with the development of SLE. In relation to clinical manifestations, 3 of the 5 SNPs tested for VDR (rs11168268, rs2248098 and rs1540339) were associated with risk of developing nephritis in the SLE patients from Recife-PE. In the population of Ribeirão Preto-SP associations with skin changes (rs11168268), immunological disorders (rs2248098), arthritis (rs3890733) and anti-DNA (rs4760648) antibodies were observed. In relation to *HLA-G*, which was studied only in the population of Recife-PE, associations were verified with: skin lesions (-725 C>G>T), immunologic abnormalities (-400 G>A and -391 G>A), hematologic manifestations (were observed in homozygous mutant allele at position -762 C>T) and arthritis (insG540). The meta-analysis demonstrated association of SLE with the insertion/deletion of 14pb the *HLA-G* gene. Thus, in this study we can conclude that *HLA-G* and *VDR* genes were associated with SLE and/or its clinical manifestations in the studied populations. Thus, these genes may influence the development of SLE.

Keywords: Systemic lupus erythematosus, Vitamin D receptor, Human Leukocyte Antigen G.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição dos genes do MHC associados com o LES de acordo com a sua localização. Classe I (laranja), classe II (roxo) e classe III (verde) (Adaptado de Sestak AL et al., 2011). **26**
- Figura 2.** Etiopatogênese do LES (Adaptado de Bertsias et al.; 2010). BCR = *B cell receptor*; FcR = *Fc Receptor*; IFN- α = Interferon alfa; IL-21 = Interleucina 21; TLR = *toll-like receptor*; UV = ultravioleta; (Adaptado de Bertsias et al., 2010). **30**
- Figura 3.** História natural do lupus eritematoso sistêmico (Adaptado de Bertsias et al.; 2010). **32**
- Figura 4.** Principal via de metabolismo da vitamina D. A vitamina D₂ proveniente da alimentação e a vitamina D₃ proveniente também da alimentação ou da fonte solar sobre o colesterol são transformadas em calcidiol no fígado e posteriormente no metabólito ativo, o calcitriol, nos rins. **38**
- Figura 5.** Localização do *HLA-G* e estrutura. Consiste de 7 íntrons (cor branca) e 8 éxons (cor verde). Observa-se que cada éxon (em verde) codifica um domínio específico da proteína (Adaptado de Yie SM, 2012). **45**
- Figura 6.** Estrutura da molécula do HLA-G. A proteína exibe um heterodímero que consiste em: domínios globulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), domínios transmembrana e citoplasmáticos e uma cadeia leve ($\beta 2$ -microglobulina, em verde). (Adaptado de Yie SM, 2012) **46**
- Figura 7.** Isoformas do HLA-G. O promotor do gene *HLA-G* tem elementos regulatórios da transcrição, assim como a região 3'UTR. O transcripto primário do HLA-G pode gerar 7 RNAm alternativos que codificam 7 diferentes isoformas da proteína (G1-G7). Todos os transcriptos primários têm em comum a presença do éxon 1, éxon 2 (codifica o domínio alfa-1) e região 3'UTR. E = éxon; LCR = região controladora de locus. (Adaptado de Yie SM, 2012). **47**

Figura 8. Funções imunorregulatórias mediadas pelo *HLA-G*. ILT2 = immunoglobulin-like transcript 2; ILT4 = immunoglobulin-like transcript 4; NKG2A = natural killer, group 2, member A receptor; KIR2DL4 = Killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL4 (Brenol CV et al., 2012).

LISTA DE TABELAS

Quadro 1. Critérios diagnóstico do Lúpus Eritematoso Sistêmico revisados em 1997 (Hochberg MC, 1997).	22
Quadro 2. Associação entre genes e a susceptibilidade ao LES demonstrada por meta-análise (Adaptado de Sestak AL et al., 2011).	27
Quadro 3. Papel das principais citocinas na patogênese do LES (Adaptado de Crispín JC; Tsokos GC, 2011).	30
Quadro 4. Principais falhas encontradas no sistema imune de pacientes com LES.	31
Quadro 5. Frequência dos principais sinais, sintomas e alterações imunológicas do LES (Adaptado de Von Feldt JM, 1995).	33
Quadro 6. Principais polimorfismos do <i>VDR</i> , sua localização e prováveis repercussões funcionais.	41
Quadro 7. Estudos publicados sobre a associação entre polimorfismos do <i>VDR</i> e o LES (Adaptado de Mao S; Huang S, 2014).	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH) ₂ D ₃	1,25 desidroxivitamina D
14bp	14 pares de bases
25(OH)D	25-hidroxivitamina D
3' -UTR	Região 3' não traduzida
5'-UTR	Região 5' não traduzida
BCR	<i>B cell receptor</i>
CD40LG	CD40 ligante
CD70	<i>Cluster of Differentiation 70</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
enhA	<i>Enhancer A</i>
FcR	<i>Fc Receptor</i>
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IFN- γ	Interferon Gama
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-23	Interleucina 23
ILT2	<i>Immunoglobulin-like transcript 2</i>
ILT4	<i>Immunoglobulin-like transcript 4</i>
IMGT	<i>International Immunogenetics Database</i>
IRF5	<i>Interferon regulatory factor 5</i>
ISRE	<i>Interferon regulatory factor 5</i>
ITGAL	<i>Integrin alpha L</i>
ITGAM	<i>Integrin alpha-M</i>
KIR2DL4	<i>Killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL4</i>
LCR	Região do locus de controle
LES	Lupus Eritematoso Sistêmico

MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
NKG2A	<i>Natural killer, group 2, member A receptor</i>
PR	Paraná
RN	Rio Grande do Norte
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RXR	Ácido retinoico X
RXR-VDR	Complexo de receptor da vitamina D com o receptor X do ácido retinoico
SNP	Polimorfismo de base única
STAT4	<i>Signal transducer and activator of transcription 4</i>
TBP	Proteína ligante do TATA
TFIIB	Fator transcritor IIB
TGF- β 1	Fator de transformação do crescimento beta
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta
VDR	Receptor da vitamina D
VDRE	Elementos responsivos a vitamina D

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
REVISÃO DA LITERATURA	20
1. LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	21
1.1 Considerações gerais	21
1.2 Epidemiologia	22
1.3 Fatores ambientais e hormonais relacionados ao LES	23
1.4 Fatores genéticos relacionados ao LES	24
1.5 Patogênese do LES	28
1.6 Manifestações clínicas	31
2. VITAMINA D	36
2.1 Considerações gerais	36
2.2 Gene VDR (Receptor da vitamina D)	40
2.3 Polimorfismos do gene <i>VDR</i>	40
3. ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO (HLA)	43
3.1 Considerações gerais	43
3.2 Gene <i>HLA-G</i> (Antígeno Leucocitário Humano G)	44
3.3 Polimorfismos do gene <i>HLA-G</i>	48
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
OBJETIVOS	59
CAPÍTULOS	61
CAPÍTULO I – VITAMIN D RECEPTOR (VDR) GENE POLYMORPHISMS AND SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS: ASSOCIATION WITH SUSCEPTIBILITY, NEPRHITIS AND IRREVERSIBLE ORGAN DAMAGE	62
CAPÍTULO II - VITAMIN D RECEPTOR (VDR) POLYMORPHISMS AND SUSCEPTIBILITY TO SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS	

CLINICAL MANIFESTATIONS	81
CAPÍTULO III - COMPREHENSIVE ANALYSIS OF POLYMORPHISMS IN THE HLA-5' UPSTREAM REGULATORY AND 3' UNTRANSLATED REGIONS IN BRAZILIAN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS	101
CONSIDERAÇÕES FINAIS	128
ANEXO	131

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma das doenças autoimunes reumatológicas mais prevalentes na população e acomete principalmente mulheres em idade fértil, sendo decorrente principalmente da quebra do mecanismo de tolerância imunológica associado a hiperreatividade de linfócitos T e B, com formação de auto-anticorpos patogênicos. Diversos órgãos e sistemas são alvos desta doença, que cursa com altos índices de morbidade, não sendo raro o desfecho fatal de alguns destes pacientes. As manifestações clínicas são múltiplas, podendo haver comprometimento articular, mucocutâneo, cardiovascular, pulmonar, renal, neurológico, hematológico e imunológico em qualquer fase da doença.

Vários fatores têm sido atribuídos a sua etiologia, todavia devido a complexidade das alterações imunorregulatórias do LES os elementos críticos para o desencadeamento da doença ainda não foram completamente elucidados. É postulado que a interação entre “gatilhos” ambientais e fatores genéticos são os causadores do LES, sendo que as alterações em genes que codificam proteínas do sistema imune têm sido especialmente implicados na etiologia da doença, por contribuir com a quebra da auto-tolerância e desenvolvimento de auto-anticorpos patogênicos.

Nos últimos anos, a identificação de polimorfismos em genes envolvidos na susceptibilidade ao LES é uma das mais importantes linhas de investigação, no sentido de entender como a autoimunidade progride e quais suas causas, sendo a detecção de polimorfismos genéticos através de tecnologias que permitem a detecção de SNPs (Polimorfismos de Base Única) alvo de diversas pesquisas. Devido à utilização de técnicas que incluem o “*genome wide*”, já foram identificados mais de 50 genes candidatos à doença. Entre eles figuram principalmente os que codificam o Antígeno Leucocitário Humano (HLA) e proteínas que participam do processo de imunomodulação.

Segundo a literatura, a vitamina D, mediada pelo seu receptor VDR (Receptor de Vitamina D), tem um papel importante na modulação de células do sistema imune e na produção de citocinas, sendo que sua deficiência pode implicar em maior gravidade e desencadeamento de doenças autoimunes. A Vitamina D exerce o seu efeito biológico através da ligação com o VDR amplamente distribuído, sendo que o seu potencial em participar da regulação imune também é sugerido pela observação de que linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas expressam o VDR.

O HLA contém genes responsáveis por ações imunorregulatórias e sua participação na implementação da resposta imune tem permitido conhecer a base genética de várias doenças autoimunes, incluindo o LES. Na região de classe Ib está situado o gene *HLA-G*, que tem um papel importante no mecanismo de tolerância imunológica, ocasionando principalmente supressão da resposta imune. Sendo assim, a expressão do *HLA-G* pode ser benéfica em algumas situações, particularmente naquelas em que a resposta imune deveria ser evitada, como no caso das doenças autoimunes.

Considerando os aspectos teóricos descritos, a hipótese deste trabalho é de que polimorfismos nos genes codificantes do *VDR* e *HLA-G* estariam associados com o desenvolvimento do LES e a modulação do fenótipo patológico da doença. Dessa forma, foi analisada a possível associação de SNPs nos genes *VDR* e *HLA-G* com a susceptibilidade e às manifestações clínicas da doença em pacientes do Nordeste e Sudeste do Brasil.

REVISÃO

REVISÃO DA LITERATURA

1. LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

1.1 Considerações gerais

O Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) é o protótipo de doença autoimune multissistêmica, sendo primariamente decorrente de anormalidades na regulação do sistema imune. Estas alterações são principalmente causadas pela perda do mecanismo de tolerância imunológica, havendo uma falha na diferenciação dos antígenos próprios dos não-próprios, causando uma resposta autoimune exacerbada (Theofilopoulos AN, 1995; Hahn BH, 2005). Entretanto, existem várias outras falhas no sistema imune do paciente com LES, e a etiologia destas alterações ainda não foi completamente elucidada, além de não sabermos quais defeitos do sistema imune são primários ou secundariamente induzidos (Hahn BH, 2005). A fagocitose, o *clearance* dos imunocomplexos, das células apoptóticas e debris celulares não funcionam adequadamente, permitindo a persistência de antígenos com a consequente formação de autoanticorpos durante anos antes mesmo dos primeiros sintomas da doença aparecerem (Arbuckle MR et al., 2003; Graham KL; Utz PJ, 2005; Muñoz LE, 2009).

A complexidade das alterações imunorregulatórias do LES tem dificultado identificar claramente os elementos críticos na imunopatogênese da doença, no entanto alguns elementos já figuram como centrais, tais como a ativação do sistema imune inato com o aumento da produção de interferon do tipo I e a resposta adaptativa aberrante com hiperativação de células B e T, resultando na produção de autoanticorpos patogênicos, os quais tem papel chave no desenvolvimento e perpetuação do LES (Rahman A; Isenberg DA, 2008).

O paciente com LES apresenta uma ampla gama de manifestações clínicas, podendo acometer quase todos os órgãos ou sistemas do organismo, sendo que os mais frequentemente envolvidos são pele, articulações, rins, sistema nervoso e hematológico (Von Feldt JM, 1995). Os sinais e sintomas da doença associados a alterações laboratoriais são utilizados para o diagnóstico do paciente e critérios diagnósticos foram desenvolvidos inicialmente em 1971, com revisões subsequentes em 1982 e 1997. A última revisão dos critérios teve o objetivo de otimizá-los, aumentando a sensibilidade e especificidade, sendo necessário pelo menos 4 de 11 diferentes sinais/sintomas da doença e/ou alterações laboratoriais para que um indivíduo seja classificado como portador de LES (Quadro 1) (Hochberg MC, 1997).

Quadro 1. Critérios diagnóstico do Lupus Eritematoso Sistêmico revisados em 1997 (Hochberg MC, 1997).

Critérios
Cutâneos
Rash malar
Rash discoide
Fotossensibilidade
Úlcera oral
Osteoarticular
Artrite
Serosite
Pleurite ou pericardite
Nefrite
Proteinúria persistente > 0,5 g/dia ou cilindros celulares na urina
Desordem neurológica
Convulsão ou psicose
Desordem hematológica
Anemia hemolítica, leucopenia <4.000, linfopenia<1.500 ou plaquetopenia<100.000
Desordem imunológica
Anti-DNA, ou Anti-SM, ou Anticorpos antifosfolipídeos
Fator antinuclear (FAN) positivo

1.2 Epidemiologia

O LES ocorre em todo o mundo, embora ainda seja uma doença subdiagnosticada em muitos países, o que dificulta estabelecer a prevalência e incidência da doença. Apesar disso, estudos epidemiológicos têm demonstrado padrões similares de incidência da doença (Danchenko N et al., 2006). Tem sido observado ainda a possibilidade da existência de um “gradiente de prevalência” entre os habitantes de alguns países da África, onde o LES parece ter menor prevalência, contrastando com outras regiões do mesmo continente onde a taxa de prevalência é elevada. A existência deste “gradiente” pode estar relacionada à alterações

genéticas, exposição a fatores ambientais específicos, ou até mesmo ao tratamento inadequado e maior índice de morte em alguns países (Bae SC et al., 1998).

A prevalência do LES varia de acordo com o gênero, idade, etnia e região geográfica. A doença apresenta uma predileção pelo sexo feminino com pico de incidência durante a idade reprodutiva. Em adultos a proporção de mulheres para homens varia de 10-15:1. De uma forma geral, a prevalência na população varia de 20-150 casos por 100.000 habitantes (Pons-Estel GJ et al., 2010), entretanto, em mulheres, a prevalência pode variar de 164 (descendentes de caucasianos) a 406 (afrodescendentes americanos) por 100.000 (Chakravarty EF et al., 2007). Devido ao aumento da detecção dos casos leves da doença a incidência quase que triplicou nos últimos 50 anos (Uramoto K et al., 1999) e varia de 1 a 25 casos por 100.000 habitantes na América do Norte, América do Sul, Europa e Ásia (Danchenko N et al., 2006; Pons-Estel GJ et al., 2010).

Por razões ainda não completamente esclarecidas, o LES nos Estados Unidos é mais prevalente entre os afrodescendentes que, em geral, possuem doença mais grave (Arbuckle MR et al., 2003). Em mulheres afrodescendentes americanas são 3-4 vezes mais frequentes, tem idade de início mais precoce e as lesões orgânicas ocorrem mais rapidamente do que em descendentes de caucasianos (Chakravarty EF et al., 2007).

Dados epidemiológicos sobre o LES no Brasil são escassos, sendo que apenas dois estudos até o momento foram realizados nas cidades de Natal-RN (Vilar M; Sato E, 2002) e Cascavel-PR (Nakashima K et al.; 2011). Na cidade de Cascavel-PR foi identificado uma incidência de 4,8 casos/100.000 habitantes/ano, mas em Natal-RN a incidência foi de 8,7casos/100.000 habitantes/ano. Esta diferença entre as incidências (quase o dobro em Natal-RN) poderia ser explicada por diversos fatores entre os quais se incluem: composição étnica (predomínio de negros e pardos em Natal-RN); localização geográfica no Nordeste do Brasil, onde o índice de radiação ultravioleta é maior; índice de desenvolvimento humano menor em Natal-RN (Nakashima K et al.; 2011).

1.3 Fatores ambientais e hormonais relacionados ao LES

Embora a etiologia do LES permaneça não completamente compreendida, fatores genéticos, étnicos, geográficos, hormonais e ambientais desempenham um importante papel na sua etiopatogênese. É postulado que a exposição a “gatilhos” ambientais em indivíduos geneticamente susceptíveis sejam os principais causadores do início da doença (Schur PH,

1995; Wong M; Tsao BP, 2006). Vários fatores ambientais têm sido implicados como possíveis deflagradores do LES ou de suas exacerbações. Dentre eles o tabagismo, a radiação ultravioleta, viroses e o uso de determinados medicamentos (lupus induzido por drogas) são os mais bem descritos. (Ghaussy NO et al., 2001; Cooper GS et al., 2002).

O tabagismo tanto constitui um fator de risco para doença como também tem sido associado a produção de anticorpos anti-DNA. Radiação ultravioleta exacerba a doença sistêmica e piora os sintomas cutâneos, no entanto não há ainda evidências totalmente conclusivas de sua implicação no desencadear da doença (Ghaussy NO et al., 2001; Cooper GS et al., 2002). Algumas viroses também vem sendo investigadas, embora ainda não existam evidências totalmente conclusivas da ligação de um vírus específico. O que mais tem recebido atenção neste sentido é o vírus *Epstein-Barr*. Mimetismo molecular entre proteínas do vírus *Epstein-Barr* e antígenos próprios tem sido postulado como tendo um papel na patogênese do LES (James JA; Robertson JM, 2012).

Fatores socioeconômicos também têm sido implicados e estudos tem demonstrado um risco até 4 vezes maior de morte naqueles de menor renda familiar (Karlson EW et al., 1995; Lotstein DS et al., 1998). O estresse emocional tem sido implicado tanto no desencadeamento quanto nas exacerbações da doença (Peralta-Ramirez MI et al., 2004), no entanto mais estudos ainda são necessários para definir o seu papel exato na etiopatogênese da doença.

Já no que diz respeito a fatores hormonais, há evidência suficiente da ação imunorregulatória de hormônios como estradiol, testosterona e progesterona. Já se sabe inclusive que principalmente o estradiol influencia a incidência e severidade do LES (McMurray RW; May W, 2003). Esta evidência é ratificada principalmente pelas seguintes observações: mulheres em tratamento com contraceptivos a base de estrógeno tem risco aumentado de desenvolver o LES (Petri M et al., 2005); tratamento a base de estrógenos em mulheres clinicamente estáveis com LES tem risco aumentado de *flares* da doença (Petri M et al, 2005); LES tem sido observado em maior frequência em indivíduos portadores de Síndrome de Klinefelter (Lahita RG, 1999); aleitamento materno tem efeito protetor para doença (Costenbader KH et al., 2007).

1.4 Fatores genéticos relacionados ao LES

Fatores genéticos podem aumentar o risco de desenvolver o LES, contribuindo com a quebra da auto-tolerância e desenvolvimento de autoanticorpos patogênicos. Todavia,

interações complexas entre genes e o ambiente são necessárias para o desenvolvimento da doença (Boackle SA, 2013; Rullo OJ, 2013).

Evidências de um componente genético para o LES são ratificadas por pesquisas em gêmeos monozigóticos e dizigóticos, ou em filhos de pacientes portadores da doença. Estudos demonstram um aumento significativo do risco entre indivíduos de uma mesma família e a taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos varia de 14-57% em comparação a 2-5% entre gêmeos dizigóticos (Deapen D, 1992). Outra demonstração da influência do componente genético da doença são os índices elevados de positividade do FAN entre crianças nascidas de pacientes com LES (Murashima A, 2004).

Pesquisas científicas têm identificado mais de 50 genes com polimorfismos (ou raramente mutações) que podem predispor ao LES (Boackle SA, 2013; Graham RR et al., 2009; Rullo OJ, 2013). Todavia, estas alterações genéticas têm sido reportadas como sendo responsáveis por cerca de 18% da susceptibilidade à doença, sugerindo uma forte influência de componentes ambientais ou epigenéticos (Boackle SA, 2013; Rullo OJ, 2013). Múltiplos genes têm sido associados ao LES, incluindo genes do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), ou que codificam componentes do sistema de complemento, além daqueles que codificam proteínas com ação imunomodulatória (Barcellos LF, 2009).

Os componentes genéticos mais comumente envolvidos na predisposição ao LES são os encontrados no *locus* do MHC (Figura 1), que inclui os genes do antígeno leucocitário humano (HLA). O MHC contém genes responsáveis pela apresentação de antígenos e também possui genes para alguns dos componentes do sistema de complemento e citocinas, além de modularem a resposta imune (Barcellos LF, 2009).

Dados sobre a relação do HLA e a susceptibilidade a doenças autoimunes reumatológicas permanecem mais no nível de associação, havendo a necessidade de uma melhor descrição dos seus mecanismos. Uma variedade de modelos têm sido postulados para explicar esta associação do ponto de vista funcional. Estes incluem principalmente a importância de polimorfismos do HLA na maturação de células T, supressão da imunidade, apresentação e processamento de antígenos e mecanismo de tolerância imunológica (Shiina T et al., 2004).

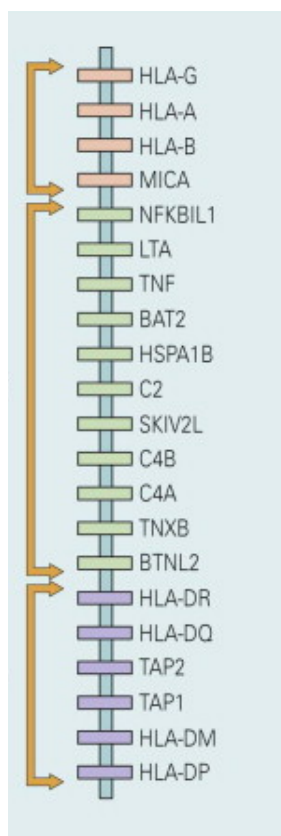


Figura 1. Distribuição dos genes do MHC associados com o LES de acordo com a sua localização. Classe I (laranja), classe II (roxo) e classe III (verde) (Adaptado de Sestak AL et al., 2011).

Outros genes que estão envolvidos na susceptibilidade ao LES incluem principalmente os que fazem parte do sistema imune inato. Muitos destes influenciam a sinalização de linfócitos, alguns dos quais modulam a ativação e supressão de linfócitos T e B. Outros genes estão relacionados ao mecanismo de *clearence* de imunocomplexos. Dessa maneira, percebe-se que as influências genéticas são complexas, e a interação entre diferentes genes e polimorfismos parecem também ser importantes (Graham RR et al., 2009; Boackle SA, 2013; Rullo OJ, 2013). Os principais genes não integrantes do MHC, que possuem associação comprovada com o LES estão relacionados no quadro 2. Além destes, outros genes também têm sido estudados, dentre os quais ganham destaque: o *IRF5* (*Interferon regulatory factor 5*), *STAT4* (*Signal transducer and activator of transcription 4*), *ITGAM* (*Integrin alpha-M*), que codificam citocinas e interferem no recrutamento de linfócitos (Abelson AK et al., 2009); e os genes do sistema de complemento como o C1q, C2 e C4, que têm influência no *clearence* de imunocomplexos (Cervino AC et al., 2007).

Quadro 2. Associação entre genes e a susceptibilidade ao LES demonstrada por meta-análise (Adaptado de Sestak AL et al., 2011).

Gene	Localização	Estudos Associados	Estudos Não Associados	Total de indivíduos na meta-análise		
				No. pacientes	No. controles	Odds ratio
<i>CR1</i>	1q32	2	19	950	1372	1.544
<i>CTLA4</i>	2q33	7	16	1144	1630	1.287
<i>FCGR2A</i>	1q23	16	31	4235	4383	1.24
<i>FCGR3A</i>	1q23	16	13	2415	1455	1.47
<i>IL10</i>	1q32	13	14	2391	3483	1.284
<i>MBL2</i>	10q11	15	12	1794	2192	1.406
<i>PDCD1</i>	2q37	16	11	2909	3995	1.194
<i>PTPN22</i>	1p13	10	2	3514	7646	1.49
<i>TNF</i>	6p21	23	17	3060	4479	1.7
<i>TNFRSF1B</i>	1p36	3	12	944	1313	1.29
<i>TNFSF4</i>	1q25	5	4	1312	1801	1.26

Em adição as alterações nos genes codificantes da imunidade inata, de proteínas com ação imunomodulatória e do sistema HLA, fatores epigenéticos também são importantes na patogênese do LES. Mecanismos epigenéticos podem representar a ligação perdida entre a genética e fatores de risco ambientais (Altork N; Sawalha AH, 2013; Shen N et al., 2012).

A acessibilidade para fatores transcricionais, e, assim, a expressão gênica, é regulada pela acetilação e metilação do DNA. A metilação do DNA tem papel importante em uma variedade de processos, tais como inativação do cromossomo X em certos tipos de câncer. Estudos têm demonstrado que a metilação é o processo epigenético mais importante no LES e poderia explicar, pelo menos em parte, a discordância observada na frequência do LES em gêmeos idênticos. Fármacos como Hidralazina e Procainamida podem inibir a metilação em pessoas saudáveis e por isso ocasionar o Lúpus induzido por drogas. Regiões regulatórias de alguns genes conhecidamente envolvidos na patogênese do LES (*ITGAL*, *CD40LG*, *CD70* e *PPP2CA*) têm sido reportados como causadores de hipometilação (Ballestar E et al., 2006). Outras anormalidades em pacientes também têm sido descritas, como falhas na transcrição gênica, alterações na regulação pós-transcricional, modificações na edição do RNA mensageiro (Sui W et al., 2013).

Além da influência na susceptibilidade à doença, polimorfismos genéticos também estão associados ao desenvolvimento de determinadas manifestações clínicas como nefrite, anemia hemolítica autoimune, trombocitopenia e Lúpus discoide, além da produção de

determinados autoanticorpos (por exemplo anti-DNA), ou mesmo envolvidos no aumento do risco de insuficiência renal crônica, sendo um marcador prognóstico (Wong M, 2006). O SNP rs7574865 G/T no terceiro íntron do *STAT4* aumenta o risco de nefrite, síndrome do anticorpo antifosfolípide e desenvolvimento de anticorpos anti-DNA (Taylor KE et al., 2008); rs6983130 do gene *LYN* diminui o risco de manifestações hematológicas do LES (Lu R et al., 2009); o gene *CRP-A* é associado com nefrite e protege contra artrite (Jönsen A, 2007); o alelo A do rs1143679 do *ITGAM* é associado com nefrite, *rash* discoide, manifestações imunológicas da doença em descendentes de caucasianos (Kim-Howard X, 2010).

Apesar dos esforços realizados nos últimos anos, uma grande proporção dos componentes genéticos da doença ainda permanecem não reconhecidos. Por isso, com o objetivo de encontrar genes candidatos e, assim, melhor elucidar a causa do LES, tem sido realizado os chamados “*genome wide*” onde centenas de SNPs podem ser avaliados em um só momento. Três “*genome wide*” realizados com pacientes lúpicos são: Hom G et al. (2008) (1311 pacientes, 1783 controles) (545.080 SNPs); consórcio SLEGEM (Harley JB, 2008) (720 pacientes, 2337 controles) (317.501 SNPs); e o de Graham et al (2008) (431 pacientes, 2155 controles) (469.094 SNPs). Esses estudos utilizaram principalmente pacientes e controles europeus (descendentes de caucasianos) e encontraram associação em comum com os genes do *HLA*, *STAT4*, *IRF5* e *ITGAM*.

1.5 Patogênese do LES

O LES é o protótipo de doença autoimune, constituindo uma síndrome caracterizada pela resposta inapropriada à antígenos próprios. No LES o sistema imune falha em controlar as células apresentadoras de antígenos, células T e células B que produzem um vasto número de autoanticorpos e citocinas, levando à infiltração de vários órgãos, ativação local de complemento e formação de imunocomplexos (Rahman A; Isenberg DA, 2008).

A resposta imune observada no LES é complexa. Sendo assim, para que um paciente desenvolva a doença, múltiplos fatores estão envolvidos e ocorrem de forma sincronizada. O sistema imune do paciente com LES tem sido extensivamente estudado e alterações foram encontradas na maioria dos seus componentes, sendo que cada uma desempenha um papel na patogênese da doença. Portadores de LES desenvolvem um processo inflamatório crônico que se manifesta pela presença de uma grande variedade de autoanticorpos e alterações na função de células T e B. As principais “falhas” do sistema imune do paciente com LES estão nas

nessas células, nos mecanismos de apresentação de antígenos e no *clearance* de autoantígenos (Theofilopoulos AN, 1995; Rahman A; Isenberg DA, 2008).

A principal característica da patogênese do LES é a resposta imune contra antígenos nucleares. Autoantígenos liberados pelas células apoptóticas são apresentadas por células dendríticas e outras células apresentadoras de antígenos (macrófagos e linfócitos B) para as células T conduzindo a sua ativação (Figura 2). Em condições normais, o *clearance* de autoantígenos é realizado sem que haja uma resposta inflamatória. No entanto, evidências sugerem que no LES há importantes alterações neste processo, devido à exposição de autoantígenos alvos ao sistema imune durante a apoptose, e à apoptose de células mononucleares e ceratinócitos, que estão aumentadas nos pacientes (Casciola-Rosen LA, 1994; Voll RE et al., 1997). Sendo assim, células apoptóticas são provavelmente uma importante fonte de antígenos. Evidências também sugerem que há uma falha no mecanismo de apresentação de antígenos pelas células dendríticas e estas anormalidades provavelmente têm um papel importante no desencadear da doença, manutenção e amplificação do processo de resposta autoimune (Frisoni L et al., 2005).

Além disso, tem sido demonstrado que alterações de monócitos e macrófagos, os quais têm uma redução na habilidade de fagocitar células apoptóticas. Ou seja, pacientes com LES têm uma produção aumentada de autoantígenos, alteração no mecanismo de apresentação dos mesmos por células dendríticas e falha no *clearance*, permitindo uma exposição prolongada de autoantígenos a células do sistema imune. Estes fatores em conjunto levam a uma quebra da tolerância imunológica contra antígenos nucleares endógenos e estimulam a produção de IFN- γ , que ativa células T (Figura 2). As células T ativadas produzem uma variedade de citocinas que possuem diferentes ações (Quadro 3), incluindo a ativação de células B. As células B produzem então anticorpos contra constituintes próprios, formando imunocomplexos (Shlomchik MJ, 2001). Os imunocomplexos desempenham papel principal no LES. Em indivíduos normais, imunocomplexos podem ser depurados pelo sistema de complemento, no entanto em pacientes com LES há também uma falha neste mecanismo levando à deposição destes nos tecidos. O dano tissular, por sua vez, é agravado pelo recrutamento de células inflamatórias, produção de citocinas e ativação da cascata de coagulação (Tsokos GC, 2011).

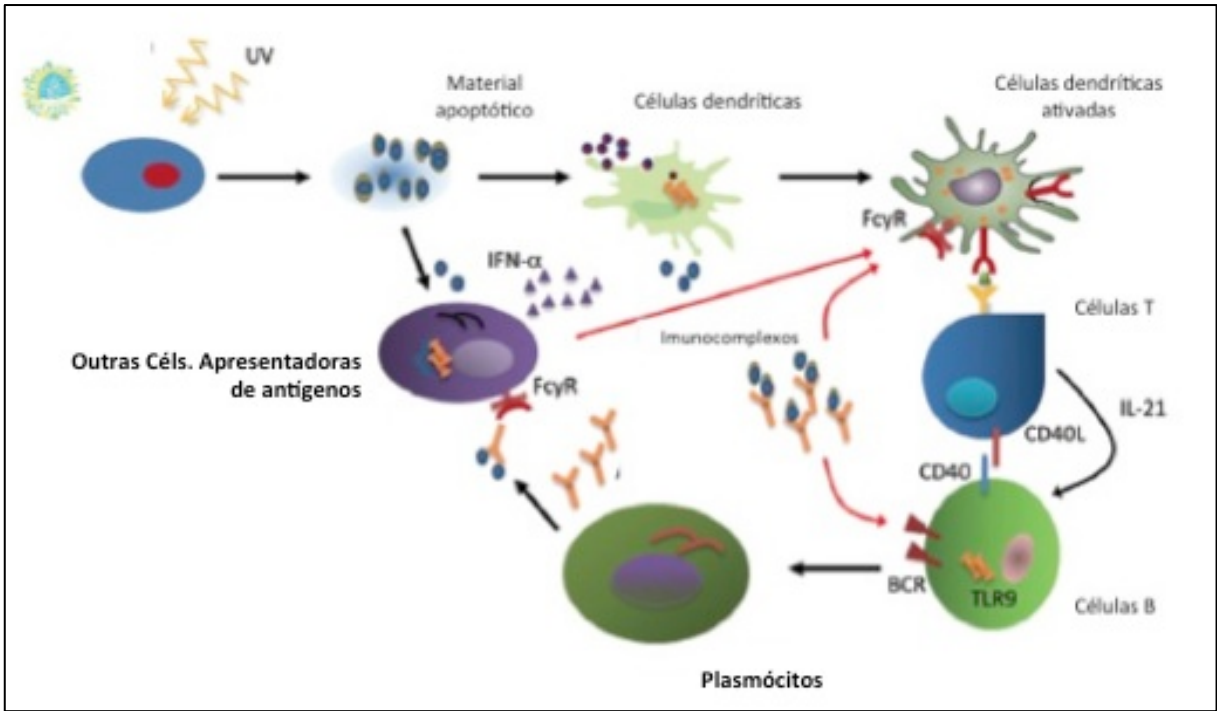


Figura 2. Etiopatogênese do lupus. BCR = *B cell receptor*; FcR = *Fc Receptor*; IFN-α = Interferon alfa; IL-21 = Interleucina 21; TLR = *toll-like receptor*; UV = ultravioleta; (Adaptado de Bertias et al., 2010).

Quadro 3. Papel das principais citocinas na patogênese do LES (Adaptado de Crispín JC; Tsokos GC, 2011).

Citocina	Efeito no LES
IL-2	Diminui a produção de células T regulatórias
IL-6	Aumento de células mononucleares
IL-10	Aumento de células mononucleares
IL-17	Aumento da produção de células T
IL-21	Aumento da produção de células T
IL-23	Aumento da produção de células mononucleadas
IFN-γ	Estímulo a Produção de células T defeituosas

Uma vez iniciada a reação imune, a presença destes autoantígenos e complexo imunes amplificam e perpetuam a resposta inflamatória. As principais alterações são sumarizadas no quadro 4.

Quadro 4. Principais falhas encontradas no sistema imune de pacientes com LES.

Células	Falha/Alteração funcional
Macrófagos	Redução na habilidade de fagocitar células apoptóticas
Células dendríticas	Apresentação anormal de antígenos próprios
Células B	Taxa de proliferação e produção de autoanticorpos aumentada Ativação policlonal e sinalização anormal Defeito na tolerância celular Hiperreatividade e hiperresponsividade
Células T	Padrão de expressão gênica alterado levando a alterações funcionais Diminuição do número de células T regulatória e capacidade diminuída de suprimir a imunidade Hiperreatividade e hiperresponsividade
Sistema de complemento	Deficiência do complemento com consequente falha na depuração de complexos imunes.

1.6 Manifestações clínicas

O LES é uma doença crônica que apresenta um curso evolutivo variável alternando períodos de remissão e exacerbação, podendo ocasionar comorbidades ou mesmo ser fatal. A doença inicia com uma fase pré-clínica caracterizada pela produção exacerbada de autoanticorpos que precede uma fase clínica órgão-específica. Posteriormente há o início de um processo crônico caracterizada pela presença de comorbidades consequentes a lesões orgânicas ou ao uso de medicamentos para tratamento da doença (Bertsias et al; 2010) (Figura 3). O dano orgânico precoce é geralmente relacionado à própria doença, enquanto o tardio é frequentemente devido à complicações como aterosclerose, infecções, malignidades, ou a efeitos adversos do uso crônico de corticosteroides ou outros imunossupressores como azatioprina e ciclofosfamida (Cervera R et al, 2003; Bertsias et al, 2010).

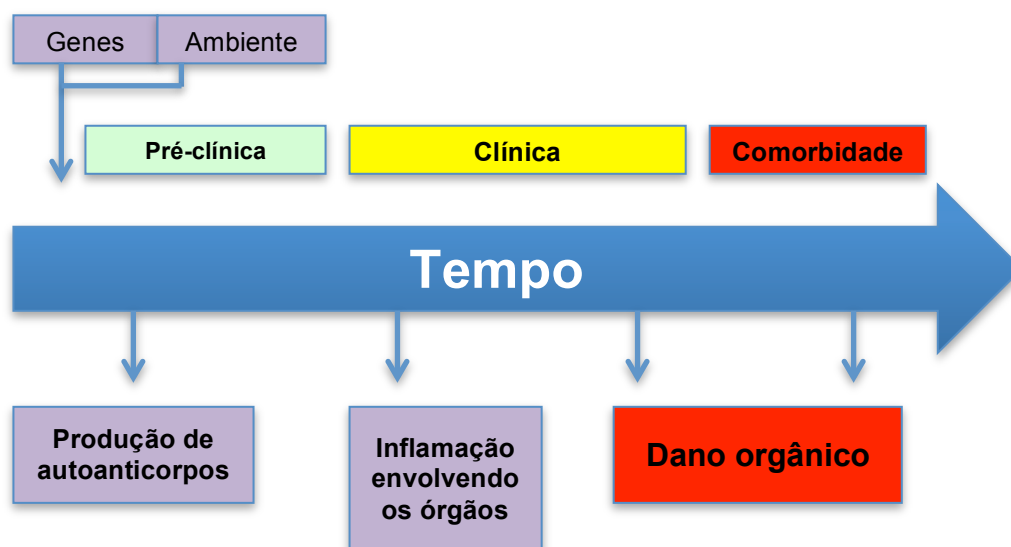


Figura 3. História natural do lúpus eritematoso sistêmico (Adaptado de Bertias et al., 2010).

O lúpus pode ser classificado em: cutâneo, sistêmico e induzido por drogas. O Lúpus induzido por drogas refere-se àquele que ocorre como consequência ao uso de medicamentos. Os sintomas são muito parecidos com o lúpus sistêmico, mas geralmente remite após a suspensão do fármaco. Os seguintes fármacos são bem definidos como causadores de lúpus induzido por drogas: procainamida, hidralazina, diltiazem, penicilamina, isoniazida, hidralazina, minociclina, anti-TNFs (principalmente infliximabe e etanercepte), interferon-alfa, metildopa, clopromazina (Hess E, 1988; Fritzler MJ, 1994; Ioannou Y; Isenberg DA, 2000).

O Lúpus cutâneo é sempre limitado à pele e identificado por inflamações cutâneas que aparecem mais frequentemente na face, nuca e couro cabeludo, representado principalmente pelo lúpus discoide. Aproximadamente 10% das pessoas com Lúpus cutâneo podem evoluir para a forma sistêmica da doença, a qual pode acometer quase todos os órgãos e sistemas sendo considerada a forma mais grave da doença (Von Feldt JM, 1995).

Mais de 50% dos pacientes lúpicos podem apresentar sintomas constitucionais como perda de peso, anorexia, febre, calafrios, fadiga. Além disso, de forma concomitante a estes, sintomas relacionados a lesões órgão-específicas também ocorrem, envolvendo principalmente articulações, pele, sistema hematológico, sistema nervosa central, pulmões,

coração, rins e trato gastrointestinal, constituindo a forma sistêmica da doença (Quadro 5) (Von Feldt JM, 1995).

Quadro 5. Frequência dos principais sinais, sintomas e alterações imunológicas do LES (Adaptado de Von Feldt JM, 1995).

Sinal/Sintoma/Alteração imunológica	Frequência (%)
Constitucionais	
Perda de peso	44-60
Fadiga	74-100
Febre	36
Sistema Musculoesquelético	
Artralgias e artrite	83-95
Cutâneos	
Fotossensibilidade	41-60
Rash malar	48-54
Púrpura	15-34
Úlceras mucosas	27-52
Alopécia	18-71
Renal	
Nefrite	50
Gastrointestinal	38-44
Pulmonar	
Derrame pleural	24
Pneumonite	29
Dor pleurítica	30-45
Cardíaco	
Pericardite	8-48
Sistema Hematológico	
Linfadenopatia	21-50
Esplenomegalia	9-20
Leucopenia	43-66
Plaquetopenia	25-50
Anemia hemolítica autoimune	10
Neurológica	
Convulsões	2-20
Psicose	5-25
Fenômeno de Raynaud	16-40
Imunológica	
FAN	95-100
Anti-DNA	66-95
Anti-SM	25
Anti-cardiolipina	34-42

1.6.1 Alterações Mucocutâneas

A maioria dos paciente com LES apresentam pelo menos uma alteração mucocutânea durante o curso da doença. Existem diversos tipos de lesões secundárias ao LES, sendo a “asa de borboleta” (*rash* malar) a mais conhecida. Esta corresponde à um eritema elevado atingindo a região malar e dorso do nariz. Muitos pacientes apresentam ainda úlceras orais ou nasais geralmente benignas e relacionadas à atividade da doença. Perfuração do septo nasal decorrente do LES é rara. Outros tipos de lesão incluem placas eritematosas planas ou elevadas que podem aparecer em qualquer parte do corpo e sensibilidade exacerbada ao sol (fotossensibilidade). Alguns pacientes desenvolvem ainda o *rash* discoide, que é uma lesão cutânea inflamatória que pode deixar cicatrizes. Alopecia também é comum, e geralmente está associada à atividade da doença, podendo ser reversível (Patel P; Werth V, 2002).

1.6.2 Sistema Musculoesquelético

Artrite e artralguas são os sintomas mais frequentes no LES e, somados, ocorrem em mais de 90% dos pacientes. A artrite geralmente é simétrica, de padrão migratório, não deformante e acomete principalmente as mãos. De forma pouco frequente, ocorre mialgias e miosite, que pode levar à fraqueza muscular grave (Fessler BJ; Boumpas DT, 1995).

1.6.3 Fenômeno de Reynaud

É uma resposta vascular exagerada geralmente induzida por estresse ou frio. Há uma vasoconstrição das artérias digitais e arteríolas cutâneas por um defeito na resposta vascular local devido ao LES, geralmente ocasionando mudança da coloração dos dedos das mãos e/ou pés (Wigley FM, 2002).

1.6.4 Renal

O acometimento renal pelo LES geralmente é identificado pela alteração da uroanálise ou provas de função renal. Pode ser consequente à uma nefropatia tubulointersticial, mas geralmente é uma glomerulonefrite e ocorre nos primeiros anos da doença, sendo muitas vezes o seu primeiro sintoma. Em muitos casos os pacientes não apresentam sintomas evidentes, mas em outros a insuficiência renal pode ser a sua manifestação inicial. Cerca de

50% dos pacientes são acometidos, e usualmente a biópsia renal é requerida para definição de qual padrão de glomerulopatia está ocorrendo (Ortega LM et al., 2010).

1.6.5 Trato gastrointestinal

É frequentemente envolvido, mais comumente por efeitos adversos das medicações empregadas para o tratamento da doença do que pela atividade dela. Gastrite e úlcera gástrica são geralmente causadas pelo uso de corticosteroides ou anti-inflamatórios não hormonais, enquanto pancreatite, peritonite, vasculite mesentérica, hepatite, colite, diarreia e perfuração intestinal devido a atividade da doença (Cervera R et al., 2003).

1.6.6 Pulmão

Pleurite, derrame pleural, pneumonite, hipertensão pulmonar, tromboembolismo pulmonar e até mesmo hemorragia alveolar podem acontecer. A presença de dispneia e dor torácica são os principais sintomas decorrentes do acometimento pulmonar pelo LES (Keane MP; Lynch JP, 2000).

1.6.7 Cardiovascular

O LES pode acometer qualquer área do coração, provocando uma miocardite, pericardite, ou endocardite. A repercussão clínica é variável e pode levar desde a dispneia ao choque cardiogênico e óbito do paciente. Além disso, devido ao processo inflamatório crônico da doença, portadores de LES têm maior risco de apresentar aterosclerose e doenças cardiovasculares como hipertensão arterial sistêmica, miocardiopatia isquêmica e acidentes vasculares cerebrais (Fessler BJ; Boumpas DT, 1995; Cervera R et al., 2003).

1.6.8 Neurológico

As complicações neurológicas mais graves secundárias ao LES são decorrentes de vasculite do sistema nervosa central. Esta pode acarretar convulsões, cefaleia e quadros psicóticos. Pode haver ainda acidente vascular encefálico isquêmico secundário a síndrome do

anticorpo antifosfolípideo. Outros problemas menos comuns incluem: neuropatia periférica, meningite asséptica, mielite e distúrbios de movimento (Hanly JG et al., 2010).

1.6.9 Oftalmológico

A principal alteração é a ceratoconjuntivite seca. Infrequentemente pode haver vasculite retiniana, episclerite, esclerite e uveíte (Fessler BJ; Boumpas DT, 1995).

1.6.10 Hematológico

Citopenia é o sinal mais frequente, sendo representada principalmente pela leucopenia, a qual ocorre em 43-66% dos pacientes. Muitos destes também apresentam anemia hemolítica autoimune, anemia secundária a doença crônica ou mesmo secundária a diminuição da função renal. Trombocitopenia também pode acontecer, mas usualmente não está associada a fenômenos hemorrágicos agudos. De forma mais infrequente também acontece uma pancitopenia secundária ao LES. Já o tromboembolismo pode ser responsável por eventos agudos e acometer vasos periféricos, ou mesmo pulmão e cérebro levando ao desfecho fatal. A síndrome do anticorpo antifosfolípideo é associada ao LES e pode estar presente em até 40% dos pacientes, sendo a principal responsável pela presença de fenômenos tromboembólicos (Bhatt AS; Berliner N, 2012).

2. VITAMINA D

2.1 Considerações gerais

A vitamina D, ou colecalciferol, é um hormônio esteroide, cuja principal função consiste na regulação da homeostase do cálcio, formação e reabsorção óssea, através da sua interação com as paratireoides, os rins e os intestinos. A principal fonte da vitamina D é representada pela formação endógena nos tecidos cutâneos após a exposição à radiação ultravioleta B (Arnson Y et al., 2007). Uma fonte alternativa e menos eficaz de vitamina D é a dieta, responsável por apenas 20% das necessidades corporais, mas que assume um papel de maior importância em idosos, pessoas institucionalizadas e habitantes de climas temperados (Brighurst FR et al., 2008).

Quando exposto à radiação ultravioleta, o precursor cutâneo da vitamina D, o 7-desidrocolesterol, sofre uma clivagem fotoquímica originando a pré-vitamina D₃. Essa molécula termolábil, em um período de 48 horas, sofre um rearranjo molecular dependente da temperatura, o que resulta na formação da vitamina D₃ (colecalfiferol). A pré-vitamina D₃ também pode sofrer um processo de isomerização originando produtos biologicamente inativos (luminosterol e taquisterol) e esse mecanismo é importante para evitar a superprodução de vitamina D após períodos de prolongada exposição ao sol. O grau de pigmentação da pele é outro fator limitante para a produção de vitamina D, uma vez que peles negras apresentam limitação à penetração de raios ultravioleta (Bringham FR et al., 2008).

No sangue, a vitamina D circula ligada principalmente a uma proteína ligadora de vitamina D, embora uma pequena fração esteja ligada à albumina. No fígado, sofre hidroxilação, mediada por uma enzima citocromo P450-like, e é convertida em 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) que representa a forma circulante em maior quantidade, porém biologicamente inerte (Bringham FR et al., 2008). A etapa de hidroxilação hepática é pouco regulada, de forma que os níveis sanguíneos de 25(OH)D refletem a quantidade de vitamina D que entra na circulação, sendo proporcional à quantidade de vitamina D ingerida e produzida na pele. A etapa final da produção do hormônio é a hidroxilação adicional que acontece nas células do túbulo contorcido proximal no rim, originando a 1,25 desidroxivitamina D 1,25(OH)₂D₃, sua forma biologicamente ativa (Dusso AS, 2005) (Figura 3). Atualmente, admite-se os seguintes valores para os níveis plasmáticos da 25(OH)D: suficiência (30 a 100 ng/dl), insuficiência (entre 20 e 30 ng/dl) e deficiência (abaixo 20 ng/dl) (Holick, 2007; Holick, et al., 2011).

Reconhece-se a existência da hidroxilação extrarrenal da vitamina D, originando a vitamina que agiria de maneira autócrina e parácrina, com funções de inibição da proliferação celular, promoção da diferenciação celular e regulação imunológica. A regulação da atividade da 1- α -hidroxilase renal é dependente da ingestão de cálcio e fósforo, dos níveis circulantes dos metabólitos da 1,25(OH)₂D₃ e do paratormônio (PTH). Por outro lado, a regulação da hidroxilase extrarrenal é determinada por fatores locais, como a produção de citocinas e fatores de crescimento, e pelos níveis de 25(OH)D, tornando essa via mais sensível à deficiência de vitamina D (Deluca HF, 2001).

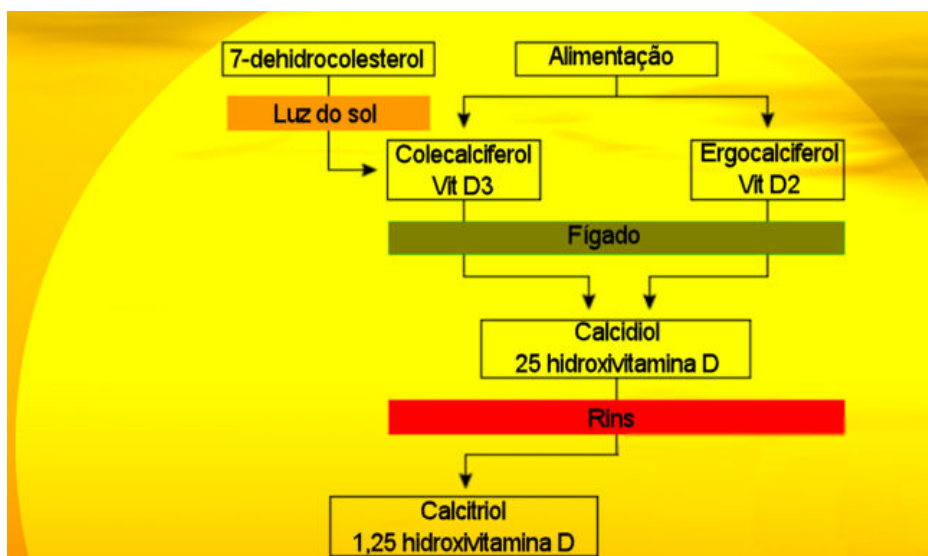


Figura 4. Principal via de metabolismo da vitamina D. A vitamina D₂ proveniente da alimentação e a vitamina D₃ proveniente também da alimentação ou da fonte solar sobre o colesterol são transformadas em calcidiol no fígado e posteriormente no metabólito ativo, o calcitriol, nos rins (Fonte: disponível em [http://www.mdsaude.com/2013/01/vitaminatml?utm_source=feedburner&utm_medium=feed&utm_campaign=Feed%3A+mdsaude+\(MD.Saude\)\)](http://www.mdsaude.com/2013/01/vitaminatml?utm_source=feedburner&utm_medium=feed&utm_campaign=Feed%3A+mdsaude+(MD.Saude)))).

A função mais bem estudada da vitamina D consiste no aumento da absorção intestinal de cálcio, participando da estimulação do transporte ativo desse íon nos enterócitos. Atua, também, na mobilização do cálcio a partir do osso, na presença do PTH e aumenta a reabsorção renal de cálcio no túbulo distal (Dusso et al., 2005; Holick, 2007; Bringham FR et al., 2008).

A vitamina D exerce suas funções biológicas através da sua ligação a receptores nucleares, os receptores para vitamina D (VDR), que regulam a transcrição do DNA em RNA, semelhante aos receptores para esteroides, hormônios tireoidianos e retinoides (Dusso et al., 2005; Holick, 2007). O receptor da vitamina D é amplamente expresso em células nucleadas e, em adição ao seu papel na homeostase do cálcio, a vitamina D potencialmente regula muitas outras funções celulares. É postulado que cerca de 3% de todo o genoma humano poderia estar sob controle da sua forma ativa. Além disso, pelo menos 10 tecidos além do rim expressam a 1 α -hidroxilase, enzima responsável por converter a vitamina D em sua forma ativa (Holick, 2007; Bouillon R, 2008; Holick et al., 2011).

Mais recentemente, têm sido evidenciadas as ações não calcêmicas da vitamina D, mediadas pelo VDR, como proliferação e diferenciação celular, além de imunomodulação. O VDR é amplamente expresso na maioria das células imunológicas (Deluca HF; Cantorna MT, 2001). A vitamina D tem efeitos bem documentados em várias células imunes entre as quais o linfócito T, linfócitos B e células dendríticas. Estas células expressam o VDR e 1 α -

hidroxilase e podem produzir 1,25(OH)₂D₃ localmente (Deluca HF; Cantorna MT, 2001). As principais alterações imunológicas relacionadas à vitamina D são: supressão do receptor celular de células T; alteração no perfil de citocinas (diminuição de IFN- γ e IL-2 e aumento do TGF- β 1, IL4, IL5 e IL10); aumento da tolerância imunológica; supressão de células Th17 envolvidas na autoimunidade; supressão da produção de IL-6, IL-12, e IL-23; regulação da diferenciação de células B; modulação da produção de imunoglobulinas; regulação de células dendríticas. Dentre os efeitos, um dos mais importantes refere-se a ação da vitamina D sobre as células dendríticas, uma vez que estas são diretamente implicadas no mecanismos de tolerância imunológica (Deluca, 2001; Kamen DL, 2006; Ruiz-Irastorza G et al., 2008).

Devido à modulação do sistema imune inato e adaptativo pela vitamina D e ampla distribuição do seu receptor em células do sistema immune, diversos estudos têm avaliado a influência da vitamina D no LES e demonstrado que a sua deficiência é mais prevalente em pacientes com LES (Fragoso et al., 2012). Uma explicação para isso pode ser o fato do paciente com a doença evitar a exposição solar, que é estabelecida como um dos desencadeantes de ativação. Até o momento, mais de 100 estudos já foram feitos a fim de avaliar se a deficiência de vitamina D poderia influenciar parâmetros clínicos da doença como atividade clínica, produção de autoanticorpos e dano orgânico irreversível. Recentemente, Sakthiswary R e Raymond AA (2013) realizaram uma meta-análise para verificar a relação entre os níveis séricos de vitamina D e os parâmetros clínicos do LES. Eles incluíram 22 estudos publicados entre os anos de 2000 e 2012, sendo 8 do continente americano (América do Sul, Central e do Norte), 6 da Europa, 6 da Ásia, 1 da Oceania e 1 da África. Os autores chegaram a conclusão de que existem evidências convincentes da relação entre os níveis séricos de vitamina D e a atividade de doença. Entretanto, ainda persiste o questionamento de quais fatores estariam implicados na deficiência de vitamina D e a importância de cada um deles separadamente. Dentre estes fatores, os mais estudados têm sido os hábitos de vida (principalmente exposição solar), alterações genéticas/funcionais no receptor da vitamina D ou em proteínas que participam do seu metabolismo (Fragoso et al., 2012).

2.2 Gene *VDR* (Receptor da Vitamina D)

A vitamina D exerce o seu efeito biológico através de sua ligação a receptores específicos denominados receptores da vitamina D (VDR). O VDR corresponde a um receptor nuclear que se liga à forma ativa da vitamina D e interage com sequências específicas de nucleotídeos de genes-alvos, produzindo uma variedade de efeitos biológicos (DeLuca HF, 2004). O VDR tem 50 kDa, pertence à classe 2 família dos receptores de hormônios da tireoide e hormônios esteroidais e é expresso na maioria das células nucleadas, inclusive nas células imunológicas (DeLuca HF; Cantorna MT, 2001).

Quando a vitamina D ativa se difunde para dentro do seu alvo celular, ela se liga ao VDR e aumenta a formação de heterodímeros de VDR, geralmente em conjunto com o ácido retinoico X (RXR). Os dímeros ativam ou reprimem a transcrição de genes alvos pela ligação a correguladores. O complexo VDR-RXR então se liga à sequências específicas em alvos da região promotora do gene que são chamados elementos responsivos a vitamina D (VDRE). Via proteína ligante do TATA (TBP) e o fator transcritor IIB (TFIIB), o VDR ganha em contato com a RNA II polimerase e outros fatores transcripcionais. Portanto, o nível de transcrição é regulado por um complexo de coativadores que se ligam ao VDR. Os VDRE são presentes principalmente em genes da homeostase do cálcio, proliferação e diferenciação celular. A ação da vitamina D, mediada pelo VDR, serve, portanto, como um importante modificador da transcrição gênica, regulando a síntese de RNA mensageiro (Dusso AS; Brown AJ, 1998).

O gene *VDR* humano localiza-se no braço longo do cromossomo 12 (12q13.11) e é composto por nove éxons, sendo o primeiro deles não transcrito, e oito íntrons (Haussler et al., 1998; Jurutka et al., 2001). Os oito éxons codificantes são transcritos para o RNA mensageiro, que por sua vez é convertido a uma proteína funcional VDR. O gene possui mais de 100 kb, apresenta uma região promotora capaz de gerar múltiplas transcrições específicas de tecidos e fica localizado próximo ao gene que codifica o colágeno tipo II- α 1 (Uitterlinden et al., 2004).

2.3 Polimorfismos genéticos do *VDR*

Até o momento, apesar do grande número de estudos populacionais, a influência dos polimorfismos do gene *VDR* sobre a função da proteína ainda não é completamente

conhecida. O gene *VDR* tem sido frequentemente avaliado para vários polimorfismos de base única (SNPs). De acordo com o Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia dos Estados Unidos (NCBI) mais de 180 polimorfismos foram identificados no locus do gene *VDR* humano, no entanto apenas dois deles, *FokI* e *Cdx-2*, são bem estudados quanto ao seu efeito funcional (Quadro 6).

Outros três SNPs *ApaI*, *TaqI* e *BsmI* também têm sido bastante estudados, no entanto seus efeitos funcionais ainda não foram elucidados. Eles estão em desequilíbrio de ligação e principalmente o *BsmI* e *TaqI* não têm ainda o seu efeito funcional na proteína completamente esclarecido, uma vez que estão localizados em regiões intrônicas, sendo assim pouco provável que influenciem diretamente o fenótipo. Por outro lado, esses SNPs intrônicos podem estar em desequilíbrio de ligação com um SNP funcional dentro de um mesmo gene ou genes adjacentes. Semelhantemente, o *TaqI* tem efeito funcional pouco definido. *FokI* e *Cdx-2* não estão em desequilíbrio de ligação com o *ApaI-TaqI-BsmI* (Whitfield GK, 2001; Uitterlinden AG, 2004).

Quadro 6. Principais polimorfismos do *VDR*, sua localização e prováveis repercussões funcionais.

SNP	Identificação	Localização	Efeito funcional
<i>Cdx-2</i>	rs17883968 (G>A)	éxon 1e	Modifica absorção do cálcio intestinal
<i>FokI</i>	rs10735810 (C>T)	éxon 2	VDR mais ativo
<i>BsmI</i>	rs1544410 (G>A)	íntron 8	Possível desequilíbrio de ligação com outros SNPs com funcionalidade e influência na estabilidade RNAm
<i>ApaI</i>	rs7975232 (T>G)	íntron 8	Possível desequilíbrio de ligação com outros SNPs com funcionalidade e influência na estabilidade RNAm
<i>TaqI</i>	rs731236 (T>C)	éxon 9	Possível desequilíbrio de ligação com outros SNPs com funcionalidade e influência na estabilidade RNAm

O *FokI* ocorre na primeira porção do códon do éxon 2 e muda o local de início da tradução, resultando em três aminoácidos menores. A proteína formada tem uma alta atividade transcricional, gerando um receptor VDR mais ativo (Whitfield GK, 2001; Van Etten E, 2007). Isto poderia levar a um aumento da funcionalidade do VDR, ocasionando uma modificação no efeito determinado pela vitamina D em diferentes células e tecidos. O efeito do *FokI* na atividade transcricional em tecidos imunes poderia acarretar um aumento da

proliferação linfocitária e da síntese de proteínas por células do sistema imune, indicando o envolvimento deste polimorfismo na imunorregulação (Whitfield GK, 2001; Van Etten E, 2007).

Quadro 7. Estudos publicados sobre a associação entre polimorfismos do *VDR* e o LES (Adaptado de Mao S; Huang S, 2014).

Primeiro autor, Ano	País	Polimorfismo	Resultado
Ozaki, 2000	Japão	<i>BsmI</i>	Associação com susceptibilidade ao LES e nefrite
Huang, 2002	Taiwan	<i>BsmI</i> e <i>FokI</i>	Associação do LES com alelo B do <i>BsmI</i>
Sakulpipatsin, 2006	Tailândia	<i>BsmI</i>	Sem associação
Abbasi, 2010	Irã	<i>BsmI</i>	Sem associação
Luo, 2012	China	<i>BsmI</i> , <i>ApaI</i> e <i>FokI</i>	Associação do <i>FokI</i> e <i>ApaI</i> com a susceptibilidade ao LES, manifestações hematológicas, anti-Sm e serosite
Monticelo, 2012	Brasil	<i>BsmI</i> e <i>FokI</i>	Sem associação
Ahmed A, 2013	Egito	<i>BsmI</i> , <i>FokI</i> e <i>ApaI</i>	Associação com nefrite, níveis de vitamina D, susceptibilidade e atividade de doença
Azevedo Silva J, 2013	Brasil	rs11168268, rs2248098, rs1540339, rs4760648 e rs3890733	Associação com artrite, lesões cutâneas e anticorpo anti-DNA
Kaletka B, 2013	Polônia	<i>BsmI</i>	Sem associação
Mostowska, 2013	Polônia	<i>BsmI</i> , <i>FokI</i> , <i>ApaI</i> e <i>TaqI</i>	Sem associação

O *Cdx-2* foi identificado pela análise sequencial da região promotora e está ligado à uma região de transcrição de uma proteína que aumenta a absorção intestinal do cálcio. Quando o alelo A está presente no locus *Cdx-2*, o fator transcricional se liga mais fortemente do que quando o alelo G está presente. Assim, a presença do alelo G rompe a ligação com o fator transcricional, ocasionando uma diminuição na transcrição do *VDR*. Além disso, o alelo A está associado ao aumento da produção de proteínas transportadoras de cálcio, pelo aumento da transcrição gênica do *VDR*. Portanto, o *Cdx-2* tem sua principal influência sobre o metabolismo do cálcio (Yamamoto et al., 1999, Arai et al., 2001).

Na última década, os polimorfismos do gene *VDR* têm sido mais enfaticamente estudados no LES em diferentes populações, todavia os resultados relatados têm sido divergentes (Quadro 7). Recentemente, foram publicadas três meta-análises envolvendo o *VDR*: Lee YH et al. (2011), Xiong J et al. (2013), Mao S e Huang S (2014). Todas as meta-análises demonstraram associação entre a susceptibilidade ao LES e o alelo B *BsmI* apenas em pacientes asiáticos. Já Mao S e Huang S (2014) também demonstraram associação entre o genótipo FF do *FokI* e a susceptibilidade à doença, mas, novamente, apenas em asiáticos. Diferenças nos resultados das populações analisadas podem ser decorrentes a fatores ambientais ou étnicos, assim como alterações epigenéticas.

3. ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO (HLA)

3.1 Considerações Gerais

O complexo maior de histocompatibilidade (MHC) refere-se a uma região que contém centenas de genes, incluindo aqueles do HLA. Assim, o MHC é frequentemente referido como sinônimo de HLA. O *HLA* ocupa o braço curto do cromossomo 6 (6p21.3) e um segmento de cerca de 3500Kb (Horton R, 2004, Shiina T, 2004).

Este complexo multigênico é dividido em classes, de acordo com a região de localização, em região de classe Ia, Ib e região de classe II. A classe Ia contém os genes que codificam os antígenos “clássicos” do *HLA* (HLA-A, B e C) e é altamente polimórfica. Estes antígenos são expressos em quase todas as células do corpo, exceto eritrócitos e trofoblastos. A classe Ib codifica principalmente genes do *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G* e possui polimorfismos limitados (Gruen JR, 1997; Shiina T, 2004).

A região de classe II compreende os genes *HLA-DR*, *DQ* e *DP*. Antígenos de classe II são constitutivamente expressos nas células B, células dendríticas e monócitos e podem modular o processo de inflamação. O MHC ainda tem duas outras regiões chamadas classe III (entre a região I e II) e IV (entre a III e I). No entanto, nelas não há genes envolvidos no HLA, mas codificam componentes do sistema de complemento como o C2 e C4, além do TNF (Gruen JR, 1997; Horton R, 2004).

3.2 Gene HLA-G (Antígeno Leucocitário Humano G)

No final da década de 80 três novos genes HLA de Classe I foram descritos e designados como genes *HLA-Ib*, por apresentarem características que os distinguiam dos genes clássicos de Classe I do sistema HLA. Com exceção do *HLA-E*, esses genes possuem diferentes mecanismos envolvidos em sua regulação, que os leva a uma distribuição restrita em determinados tecidos, além do número reduzido de alelos (Koller et al., 1988). Todos eles possuem características as quais favorecem a tolerância imunológica (Sullivan et al., 2006).

O *HLA-G* faz parte da região de classe Ib, juntamente com o *HLA-E* e *HLA-F* (Geraghty DE, 1987). O *HLA-G* difere dos genes HLA “clássicos” (A, B e C) pela estrutura do gene, polimorfismos, expressão e função. Além disso, o *HLA-G*, apresenta poucas variações de proteína em comparação às 462 do *HLA-A* (Kovats S et al., 1990).

O gene *HLA-G* é composto de 8 éxons, 7 íntrons, região 3' não traduzida e 5'UTR (Solier et al., 2001; Moreau et al., 2009). O éxon 1 codifica o sinal peptídico, éxons 2, 3 e 4 os domínios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ respectivamente, éxons 5 e 6 codificam o domínio citoplasmático e transmembrana da cadeia pesada; O éxon 7 é sempre ausente do RNAm maduro devido ao códon de interrupção no éxon 6 (Carosella ED et al., 2008; Yie SM, 2012). A região do éxon 8 codifica a 3'UTR que apresenta diversos elementos regulatórios, incluindo aqueles que regulam os elementos de expressão do RNAm (Kuersten S; Goodwin EB, 2003) (Figura 5).

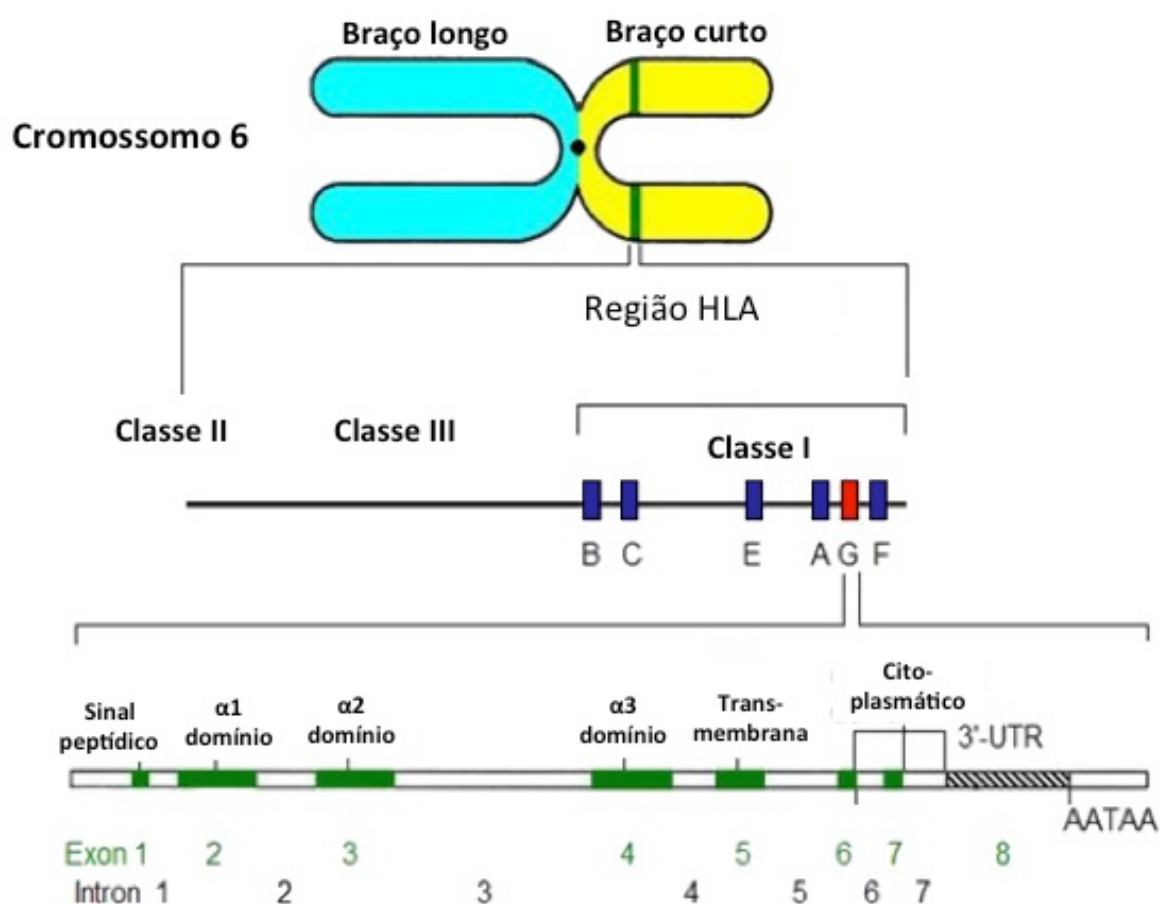


Figura 5. Localização do *HLA-G* e estrutura. Consiste de 7 íntrons (cor branca) e 8 éxons (cor verde). Observa-se que cada éxon (em verde) codifica um domínio específico da proteína (Adaptado de Yie SM, 2012).

A taxa de RNAm funcional de um determinado gene é regulado pela nível de síntese, principalmente determinada pela região promotora (5'UTR) do gene (Kuersten; Goodwin, 2003). Os elementos reguladores da expressão de HLA estão localizados principalmente na região promotora do gene, formando um módulo de indução. Estes elementos são também referidos como sequências de ação *cis*, por estarem nas adjacências e na mesma fita do DNA do gene alvo. São eles: *enhancer A* (enhA), o ISRE (Elemento de Resposta ao Interferon) e o módulo SXY. Todos são sensíveis às proteínas das famílias NF-κB, que são proteínas reguladoras da transcrição, também denominadas fatores transcricionais (Solier et al., 2001).

O promotor do *HLA-G* é diferente quando comparado a todos os outros do HLA, pois tem uma sequência modificada do enhA e o ISRE está ausente, o que torna a região promotora não responsiva ao NF-κB e ao IFN-γ. Além disso o módulo SXY usualmente consiste do S, X1, X2 e Y nos genes *HLA-I*, sendo que no *HLA-G* estão presentes apenas S e

X1, e poucos elementos regulatórios alternativos para sua transcrição. Estes elementos regulatórios do *HLA-G* incluem a região controladora de locus (LCR), que está localizada a aproximadamente 1,2 kb do códon ATG de iniciação (Yie SM, 2012). A região 3'UTR do *HLA-G* também exibe diversos elementos regulatórios que influenciam a estabilidade do RNAm, *turnover* e o padrão de *splicing*. Todos esses elementos regulatórios em conjunto, levam a formação de 7 RNAm alternativos que codificam diferentes isoformas da proteína (Donadi et al., 2011).

A proteína HLA-G exibe um heterodímero, consistindo em domínios globulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$, domínios transmembrana e citoplasmáticos) e uma cadeia leve ($\beta 2$ -microglobulina) (Figura 6). As proteínas de HLA-G podem ocorrer em diferentes isoformas (quatro ligadas à membrana, G1-G4, e três formas solúveis, G5-G7), e são geradas por *splicing* alternativo (Figura 7). Dependendo do tipo de célula e da condição fisiológica, diferentes isoformas de HLA-G são produzidas. Todas as isoformas contêm pelo menos um domínio alfa-1, e a HLA-G1 é a isoforma completa. No HLA-G2 falta o éxon 3 e HLA-G3 faltam os éxons 3 e 4. HLAG1-G4 são moléculas ligantes de membrana (Yie SM, 2012).

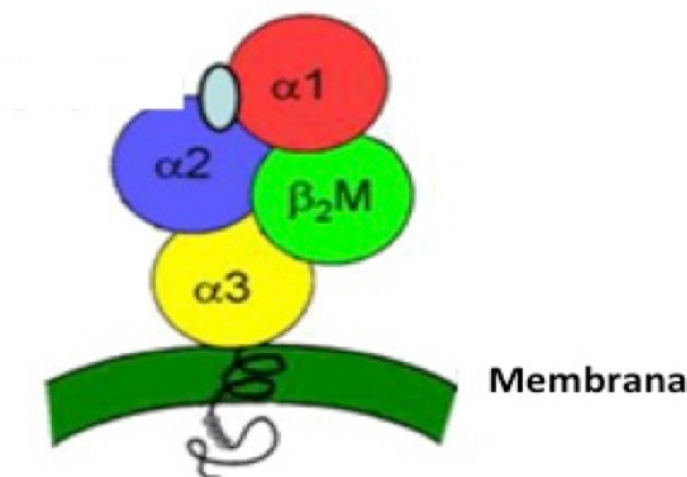


Figura 6. Estrutura da molécula do HLA-G. A proteína exibe um heterodímero que consiste em: domínios globulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$), domínios transmembrana e citoplasmáticos e uma cadeia leve ($\beta 2$ -microglobulina, em verde). (Adaptado de Yie SM, 2012)

Nas isoformas G5-G7, os domínios transmembrana e citoplasmático não são traduzidos, resultando em formas solúveis. Devido a uma mutação, o HLA-G apresenta uma cauda citoplasmática que é menor que as existentes nos HLA-A, B e C. Essa característica tem implicações importantes para a expressão do HLA-G, já que proporciona uma expressão

mais prolongada de HLA-G na superfície celular em comparação com as moléculas de HLA clássicas (Brenol CV et al., 2012).

A expressão de proteínas HLA-G tem sido descrita em sítios imunoprivilegiados como o timo, e em determinadas células do sistema imune, como por exemplo, os monócitos e linfócitos, estando possivelmente associado a mecanismos inflamatórios, bem como inibitórios das células *Natural Killer*, e células T (Carosella et al., 2008; Donadi et al., 2011; Brenol CV et al., 2012).

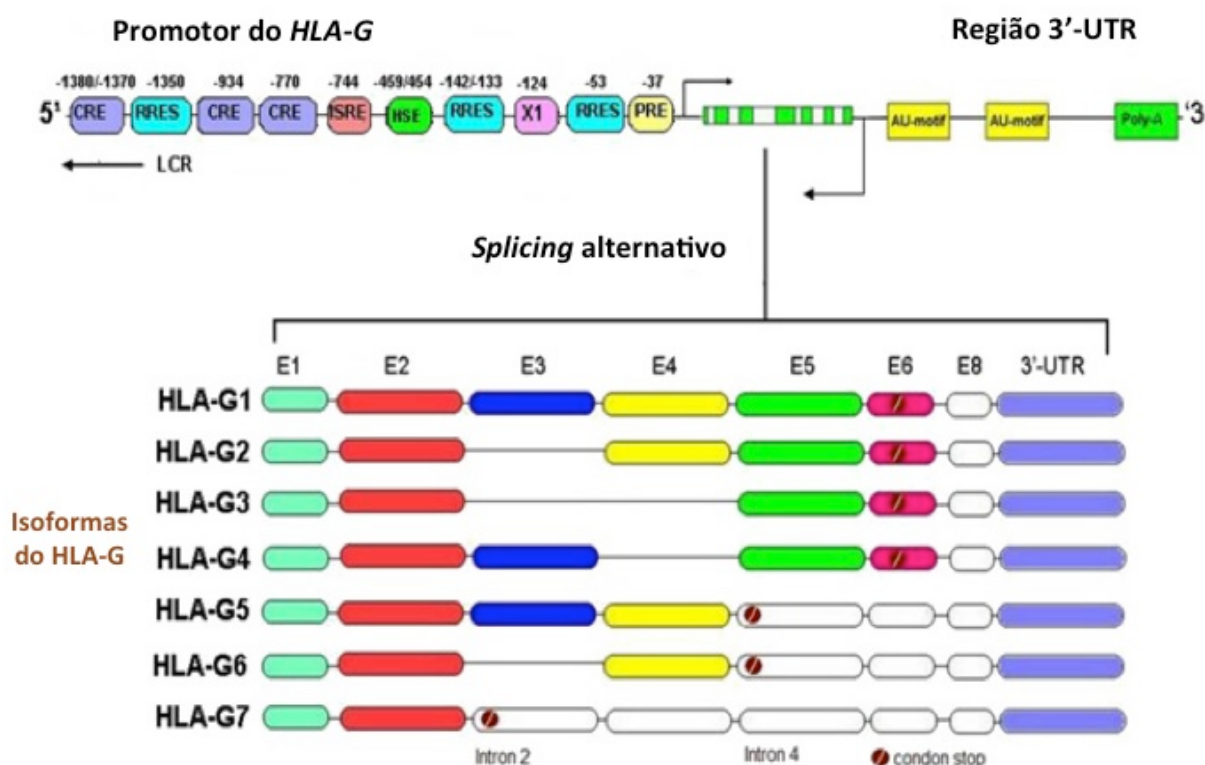


Figura 7. Isoformas do HLA-G. O promotor do gene *HLA-G* tem elementos regulatórios da transcrição, assim como a região 3'UTR. O transcrito primário do HLA-G pode gerar 7 RNAm alternativos que codificam 7 diferentes isoformas da proteína (G1-G7). Todos os transcripts primários têm em comum a presença do éxon 1, éxon 2 (codifica o domínio alfa-1) e região 3'UTR. E = éxon; LCR = região controladora de locus. (Adaptado de Yie SM, 2012).

Tem sido demonstrado que o HLA-G é uma molécula que tem um papel importante no mecanismo de tolerância imunológica e já existem argumentos convincentes de que o HLA-G desempenha papel importante na regulação do sistema imunológico: (1) É capaz de ligar-se a vários tipos de receptores, alguns dos quais são amplamente distribuídos entre as células imunes; (2) o HLA-G pode exercer efeitos tolerogênicos de longo prazo por meio da geração de células supressoras; e mesmo as células que não transcrevem HLA-G podem tornar-se temporariamente HLA-G-positivas, adquirindo um perfil imunossupressivo por meio de um

fenômeno chamado trogocitose (captação intercelular de HLA-G pela incorporação de fragmentos de membrana que expressam essa molécula) (Brenol CV et al., 2012). As principais ações imunorregulatórias do *HLA-G* estão ilustradas na Figura 8.

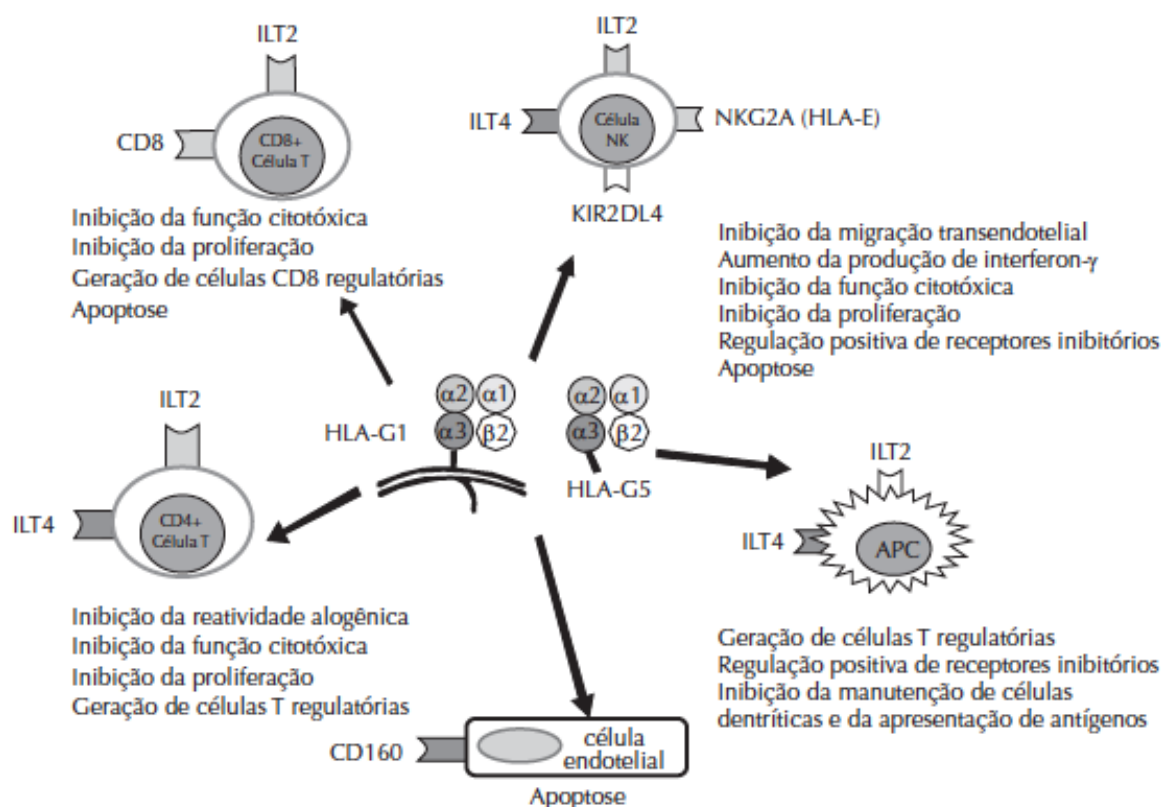


Figura 8. Funções imunorregulatórias mediadas pelo *HLA-G*. ILT2 = immunoglobulin-like transcript 2; ILT4 = immunoglobulin-like transcript 4; NKG2A = natural killer, group 2, member A receptor; KIR2DL4 = Killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL4. (Brenol CV et al, 2012)

Sendo assim, o HLA-G ocasiona principalmente uma supressão da resposta imune (Carosella et al., 2008) e a expressão do *HLA-G* pode ser prejudicial ou benéfica, dependendo da condição patológica envolvida: situações nas quais se faz necessário uma reação imune mais vigorosa (tumores e infecções) é prejudicial, enquanto naquelas em que a resposta imune deveria ser evitada (doenças autoimunes e transplante) torna-se benéfica (Donadi EA et al., 2011).

3.3. Polimorfismos do Gene *HLA-G*

A maioria dos genes estruturais no genoma humano possui um alelo predominante “tipo selvagem”, que está presente na maioria dos indivíduos. Isso não ocorre para os genes

HLA de Classe I e II, pois muitos alelos estão presentes em frequências relativamente iguais. No genoma humano, as variações nucleotídicas observadas, por exemplo, entre alelos de um mesmo gene *HLA* de classe I clássico, podem diferir consideravelmente. Algumas variantes alélicas *HLA* são restritas ou ausentes em certos grupos populacionais, enquanto outras apresentam diferenças de frequência em diferentes populações. Além disso, a importante participação dos genes *HLA* na implementação da resposta imune tem permitido também o entendimento de como esta diversidade influencia a base genética de várias doenças (Van Der Ven et al., 2000).

O gene *HLA-G* tem variações nucleotídicas que podem influenciar a formação de proteínas funcionais e a expressão gênica, especialmente aquelas relacionadas à região promotora e 3'UTR. Quarenta e sete alelos codificantes do *HLA-G* foram definidos, baseados em cerca de 70 SNPs observados entre o éxon 1 e o íntron 6. A variabilidade de nucleotídeos na região codificante do *HLA-G* é distribuída entre os éxons 2, 3 e 4 assim como nos íntrons (Donadi et al., 2011) e codificam 15 diferentes proteínas funcionais, e 2 alelos nulos, que codificam proteínas modificadas de acordo com o *International Immunogenetics Database (IMGT/HLA Database version 3.8.0)* (Robinson J et al., 2011).

Em contraste com a região codificante, a região 3'UTR do gene *HLA-G* tem um alto grau de variação, apresentando 8 SNPs, dentre estes, o mais estudado consiste na deleção/inserção de 14 pares de bases (14 pb), e sua inserção está associada à níveis reduzidos de RNA mensageiro. O polimorfismo de deleção/inserção de 14 pb localizado na posição +2960 no éxon 8 (rs1704) tem atraído a atenção devido ao seu papel em potencial de splicing alternativo e estabilidade do RNA. A frequência do alelo *HLA-G*01:01:02*, o qual está relacionado com o polimorfismo 14pb inserção/deleção (+14pb/- 14pb) no éxon 8, também desperta curiosidade pela possibilidade de fazer parte de uma linhagem mais ancestral quando comparado com os demais alelos (Castro et al, 2000). Foi demonstrado que as transcrições com a sequência 14 pb podem sofrer uma etapa adicional de splicing que retira 92 pb da região em que esta sequência está localizada (Rousseau P et al., 2003).

O promotor do *HLA-G* tem 29 SNPs, e muitos deles coincidem com ou são próximos à elementos regulatórios, podendo modificar fatores regulatórios. Em alguns casos, polimorfismos na região promotora podem estar em desequilíbrio de ligação com variantes da região 3'UTR e alguns deles poderiam influenciar o splicing alternativo e a estabilidade do RNAm (Yie SM, 2012).

Até o momento, os elementos críticos da etiopatogenia do LES, principalmente o impacto das alterações genéticas, ainda não foram completamente esclarecidos. A melhor elucidação do componente genético do LES poderia auxiliar a identificar os mecanismos de como a doença se inicia, levando ao surgimento de tratamento específicos na fase preliminar ou até mesmo ao desenvolvimento de estratégias preventivas.

Neste contexto, o gene *HLA-G* e *VDR* têm ganhado destaque nos últimos anos pelo seus papéis na modulação do sistema imune e suas relações com o desenvolvimento de doenças autoimunes, incluindo o LES. Sendo assim, a hipótese deste estudo é que polimorfismos nos genes que codificam o HLA-G e o VDR estariam envolvidos na susceptibilidade ao LES e na modulação do fenótipo patológico da doença.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abelson AK, Delgado-Vega AM, Kozyrev SV, et al. STAT4 associates with systemic lupus erythematosus through two independent effects that correlate with gene expression and act additively with IRF5 to increase risk. *Ann Rheum Dis* 2009; 68:1746.

Arai, H, Miyamoto KI, Yoshida M, et al. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. In *J Bone Miner Res* 2001; 16:256-64

Arbuckle MR, James JA, Dennis GJ, et al: Rapid clinical progression to diagnosis among African-American men with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2003; 12:99-106.

Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349:1526.

Arnsen Y, Amital H, Shoenfeld Y. Vitamin D and autoimmunity: new etiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis* 2007; 66:1137-42.

Altork N, Sawalha AH. Epigenetics in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2013; 25:569.

Bae SC, Fraser P, Liang MH. The epidemiology of systemic lupus erythematosus in populations of African ancestry: a critical review of the “prevalence gradient hypothesis”. *Arthritis Rheum* 1998; 41:2091-9.

Ballestar E, Esteller M, Richardson BC. The epigenetic face of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2006; 176:7143-7.

Barcellos LF, May SL, Ramsay PP, et al. High-density SNP screening of the major histocompatibility complex in systemic lupus erythematosus demonstrates strong evidence for independent susceptibility regions. *PLoS Genet* 2009; 5:e1000696.

Bertsias GK, Salmon JE, Boumpas DT. Therapeutic opportunities in systemic lupus erythematosus: state of the art and prospects for the new decade. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1603-11.

Bhatt AS, Berliner N. Hematologic Manifestations of SLE. In: *Lupus Erythematosus: Clinical Evaluation and Treatment*, Schur P, Massarotti E. (Eds), Springer, New York 2012.

Boackle SA. Advances in lupus genetics. *Curr Opin Rheumatol* 2013; 25:561.

Brenol CV, Veit TD, Chies JB, et al. O papel do gene e da molécula HLA-G na expressão clínica das doenças reumatológicas. *Revis Bras de Reumatol* 2012; 52(1):82-91.

Bringhurst FR, Demay MB, Kronenberg HM. Hormones and Disorders of Mineral Metabolism. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR editors. Williams Textbook of Endocrinology, 11 ed. Philadelphia; Elsevier, 2008.

Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, et al. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood* 2008; 111:4862-70.

Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A: Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 1994; 179:1317-30.

Castro, MJ, Morales P, Martinez-Laso J. Evolution of MHC-G in humans and primates based on three new 3'UTR polymorphisms. *Human Immunology* 2000; 61:1157–63.

Cervera R, Khamashta MA, Font J, et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 1993; 72:113–24.

Cervino AC, Tsinoremas NF, Hoffman RW: A genome-wide study of lupus: preliminary analysis and data release. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1110:131-39.

Chakravarty EF, Bush TM, Manzi S, et al. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis Rheum* 2007; 56:2092.

Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, et al. Risk factors for development of systemic lupus erythematosus: allergies, infections, and family history. *J Clin Epidemiol* 2002; 55:982.

Costenbader KH, Feskanich D, Stampfer MJ et al. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum* 2007; 56:1251.

Crispín JC, Tsokos GC. Pathogenesis of lupus. In: Hochberg MC; Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH editors. *Textbook of Rheumatology* 5ed., Philadelphia; Elsevier, 2011..

Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus* 2006; 15:308.

Deapen D, Escalante A, Weinrib L, et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1992; 35:311.

DeLuca HF, Cantorna MT. Vitamin D - its role and uses in immunology. *FASEB Journal* 2001; 15:2579-85.

DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004. 80(6):1689S-96S.

Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68:369-95.

Dusso AS, Brown AJ. Mechanism of vitamin D action and its regulation. *Am J Kidney Dis.* 1998; 32(2):S13-24.

Dusso AS, Brown AJ, Slatapolski, E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289(1): F8-F28.

Elkon K. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 1995; 7:384.

Fessler BJ, Boumpas DT. Severe major organ involvement in systemic lupus erythematosus. Diagnosis and management. *Rheum Dis Clin North Am* 1995; 21:81.

Fragoso TS, Dantas AT, Marques CD, et al. 25-Hydroxyvitamin D3 levels in patients with systemic lupus erythematosus and its association with clinical parameters and laboratory tests. *Rev Bras Reumatol* 2012; 52(1):60-65.

Frisoni L, McPhie L, Colonna L, et al: Nuclear autoantigen translocation and autoantibody opsonization lead to increased dendritic cell phagocytosis and presentation of nuclear antigens: a novel pathogenic pathway for autoimmunity?. *J Immunol* 2005; 175:2692-2701.

Fritzler MJ. Drugs recently associated with lupus syndromes. *Lupus* 1994; 3:455.

Geraghty, D.E. Structure of the HLA class I region and expression of its resident genes. *Immunology* 1993; 5: 3-7.

Ghaussy NO, Sibbitt WL Jr, Qualls CR. Cigarette smoking, alcohol consumption, and the risk of systemic lupus erythematosus: a case-control study. *J Rheumatol* 2001; 28:2449.

Graham KL, Utz PJ. Sources of autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17:513.

Graham RR, Cotsapas C, Davies L, et al. Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2008; 40:1059-61.

Graham RR, Hom G, Ortmann W, Behrens TW. Review of recent genome-wide association scans in lupus. *J Intern Med* 2009; 265:680.

Gruen JR, Weissman SM. Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood* 1997; 90:4252.

Harley JB, Alarcon-Riquelme ME, Criswell LA, et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet* 2008; 40:204-10.

Hess E. Drug-related lupus. *N Engl J Med* 1988; 318:1460.

Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 9:1725

Hom G, Graham RR, Modrek B, et al: Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med* 2008; 358:900-09.

Ioannou Y, Isenberg DA. Current evidence for the induction of autoimmune rheumatic manifestations by cytokine therapy. *Arthritis Rheum* 2000; 43:1431.

Jurutka PW, Whitfield GK, Hsieh JC, et al. Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression. *Rev Endocr Metab Disord* 2001; 2(2):203-16.

Koller, BH; Geraghty, DE; Shimizu, Y, et al. Novel HLA Class I Gene Expressed in Resting T Lymphocytes. *J Immunol* 1988;141(3):897-904.

Hahn BH, Ebling F, Singh RR, et al. Cellular and molecular mechanisms of regulation of autoantibody production in lupus. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1051:433.

Hanly JG, Urowitz MB, Su L, et al. Prospective analysis of neuropsychiatric events in an international disease inception cohort of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:529.

Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998;13(3):325-49.

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

Horton R, Wilming L, Rand V, et al. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* 2004; 5:889.

James JA, Robertson JM. Lupus and Epstein-Barr. *Curr Opin Rheumatol* 2012; 24:383.

Jönsen A, Gunnarsson I, Gullstrand B, et al. Association between SLE nephritis and polymorphic variants of the CRP and FcγRIIIa genes. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46:1417.

Kamen DL, Cooper GS, Bouali H, et al. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2006; 5:114-7.

Karlson EW, Daltroy LH, Lew RA, et al: The independence and stability of socioeconomic predictors of morbidity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1995; 38:267-73.

Keane MP, Lynch JP 3rd. Pleuropulmonary manifestations of systemic lupus erythematosus. *Thorax* 2000; 55:159.

Kim-Howard X, Maiti AK, Anaya JM, et al. ITGAM coding variant (rs1143679) influences the risk of renal disease, discoid rash and immunological manifestations in patients with systemic lupus erythematosus with European ancestry. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1329.

Kuersten S, Goodwin EB. The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet* 2003; 4(8):626-37.

Lahita RG. The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 1999; 11:352.

Lee YH, Bae SC, Choi SJ, et al. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2011; 38:3643–3651.

Lotstein DS, Ward MM, Bush TM, et al: Socioeconomic status and health in women with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1998; 25:1720-29.

Lu R, Vidal GS, Kelly JA, et al. Genetic associations of LYN with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2009; 10:397.

Mao S, Huang S. Association between vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI and TaqI polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Rheumatol Int* 2014 Mar;34(3):381-8.

McMurray RW, May W. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis Rheum* 2003; 48:2100.

Milford EL, Carpenter CB. Adaptive immunity: Histocompatibility antigens and immune response genes. In: *ACP Medicine*, 2004.

Monticielo OA, Teixeira T de M, Chies JA, et al. Vitamin D and polymorphisms of VDR gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2012; 31(10):1411-21.

Moureau P, Flajollet S, Carosella ED. Nonclassical transcriptional regulation of HLA-G: an update. *J Cell Mol Med* 2009; 13:2973-89.

Muñoz LE, Janko C, Grossmayer GE, et al. Remnants of secondarily necrotic cells fuel inflammation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009; 60:1733.

Murashima A, Fukazawa T, Hirashima M, et al. Long term prognosis of children born to lupus patients. *Ann Rheum Dis* 2004; 63:50.

Nakashima K, Galhardo AP, Ferreira J, et al. Incidência e aspectos clínico-laboratoriais do lúpus eritematoso sistêmico em cidade do Sul do Brasil, *Rev Bras Reumatol* 2011; 51(3):231-9.

Ortega LM, Schultz DR, Lenz O, et al. Review: Lupus nephritis: pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions. *Lupus* 2010; 19:557.

Patel P, Werth V. Cutaneous lupus erythematosus: a review. *Dermatol Clin* 2002; 20:373.

Peralta-Ramirez MI, Jimenez-Alonso J, Godoy-Garcia JF, et al. The effects of daily stress and stressful life events on the clinical symptomatology of patients with lupus erythematosus. *Psychosomatic Med* 2004; 66:788-94.

Petri M, Kim MY, Kalunian KC, et al. Combined oral contraceptives in women with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2005; 353:2550.

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

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

Robinson J, Mistry K, McWilliam H, et al. The IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res* 2011; 39:1171-6.

Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, et al. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3'UTR region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* 2003; 64(11):1005-10.

Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Olivares N, et al. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. *Rheumatology* 2008; 47:920-3.

Rullo OJ, Tsao BP. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2013; 72(2):ii56-61.

Sakthiswary R, Raymond AA. The clinical significance of vitamin D in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *PLoS One*. 2013; 8(1):e55275.

Sestak AL, Kelly A, Harley JB. Genetics of lupus. In: Hochberg MC; Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH editors. *Textbook of Rheumatology* 5ed., Philadelphia; Elsevier, 2011.

Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* 2004; 64:631.

Schur PH. Genetics of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1995; 4:425.

Shen N, Liang D, Tang Y, et al. MicroRNAs--novel regulators of systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8:701.

Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations. *Tissue Antigens* 2004; 64:631.

Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ: From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2001; 1:147-53.

Solier C, Mallet V, Lenfant F, et al. HLA-G unique promoter region: functional implications. *Immunogenetics* 2001; 53:617-25.

Sui W, Hou X, Che W, et al. The applied basic research of systemic lupus erythematosus based on the biological omics. *Genes Immun* 2013; 14:133.

Sullivan LC, Hoare HL, Mccluskey J, Rossjohn J, Brooks AG. A structural perspective on MHC class Ib molecules in adaptive immunity. *Trends Immunology* 2006; 27(9):413-20.

Taylor KE, Remmers EF, Lee AT, et al. Specificity of the STAT4 genetic association for severe disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet* 2008; 4:e1000084.

Theofilopoulos AN. The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition. *Immunol Today* 1995; 16:90.

Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2011; 365:2110.

Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 2004. 338(2):143-56.

Uramoto KM, Michet CJ Jr, Thumboo J, et al. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis Rheum* 1999; 42:46.

Van Der Ven K, Pfeiffer K, Skrablin S. HLA-G polymorphisms and molecule function - Questions and more questions – A review. *Placenta* 2000; 7(4): 373-8.

Van Etten E, Verlinden L, Giulietti A, et al. The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. *Eur J Immunol* 2007. 37(2):395-405

Vilar M, Sato E. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus* 2002; 11(8): 528-532.

Voll RE, Herrmann M, Roth EA, et al. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997; 390: 350-1.

Von Feldt JM. Systemic lupus erythematosus. Recognizing its various presentations. *Postgrad Med* 1995; 79: 83-6.

Wigley FM. Clinical practice. Raynaud's Phenomenon. *N Engl J Med* 2002; 347:1001.

Whitfield GK, Remus LS, Jurutka PW, et al. Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 177(1-2):145-59.

Wong M, Tsao BP. Current topics in human SLE genetics. *Springer Semin Immunopathol* 2006; 28:97.

Xiong J, He Z, Zeng X, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol* 2013; Dec 9.

Yamamoto H, Miyamoto K, Li B, et al. The caudal related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. *In J Bone Miner Res* 1999; 14:240-47.

Yie SM. HLA-G (major histocompatibility complex, class I, G). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. January 2012.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Geral

O objetivo foi avaliar a associação de polimorfismos dos genes *VDR* e *HLA-G* na predisposição ao Lúpus Eritematoso Sistêmico e na modulação do fenótipo da doença.

Específicos

- Determinar a frequência dos polimorfismos dos genes codificantes do *VDR* e *HLA-G* em paciente com LES e indivíduos saudáveis;
- Avaliar o grau de associação desses polimorfismos com a susceptibilidade ao LES;
- Avaliar o grau de associação desses polimorfismos com as manifestações clínicas e alterações laboratoriais da doença.

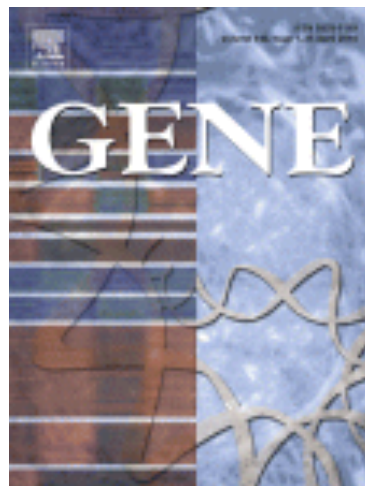
CAPÍTULOS

CAPÍTULO I

CAPÍTULO I – VITAMIN D RECEPTOR (VDR) GENE POLYMORPHISMS AND SISTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS: ASSOCIATION WITH SUSCEPTIBILITY, NEPHRITIS AND IRREVERSIBLE ORGAN DAMAGE

A ser enviado a revista “Gene”.

Fator de impacto (2012): 2.196



VITAMIN D RECEPTOR (VDR) GENE POLYMORPHISMS AND SYSTEMIC LUPUS
ERYTHEMATOSUS: ASSOCIATION WITH SUSCEPTIBILITY, NEPRHITIS AND
IRREVERSIBLE ORGAN DAMAGE

Authors

Thiago Sotero Fragoso^a, Jaqueline de Azevedo Silva^{a,c}, Andrea Tavares Dantas^b, Henrique de Ataíde Mariz^b, Alexandre Domingues Barbosa^{a,b}, Angela Luiza Branco Pinto Duarte^b, Sergio Crovella^{a,c}, Paula Sandrin-Garcia^{a,c}.

Affiliation

^aLaboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^bDivision of Rheumatology, Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco, Brazil.

^cDepartment of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Corresponding author:

Paula Sandrin-Garcia; e-mail: paula.sandrin@ufpe.br

Department of Genetics/ Federal University of Pernambuco

Av. Moraes Rego, 1235, Recife/ Brazil CEP 50760-901

Telephone/ Fax 55 8121268522

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a complex chronic autoimmune disease with heterogeneous clinical manifestations. In recent years, the several “roles” of vitamin D have been highlighted, including its importance in the regulation of immune system. Vitamin D exerts its effects through the Vitamin D receptor (VDR) and it is known that polymorphisms in the *VDR* gene may affect transcript levels, transcript stability or the functional integrity of the protein. Thus, we performed a case-control study with 5 Tag SNPs, covering the main regions of *VDR* gene. We enrolled 127 SLE patients and 138 healthy individuals from Northeast of Brazil. SNPs rs11168268 (A>G) (genotype G/G; OR = 2.72; *p-value* = 0.008) and rs2248098 (A>G) (genotype G/G; OR = 0.44; *p-value* = 0.020 and genotype A/G; OR = 0.46; *p* = 0.010) was associated with SLE susceptibility. We also observed association of rs11168268, rs1540339 and rs2248098 with SLE renal disease. In conclusion, VDR could be hypothesized as involved in SLE susceptibility, and the associated polymorphisms could serve as genetic markers for SLE renal disease, one of the clinical features with the worst prognosis.

KEYWORDS: Vitamin D Receptor (VDR), Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), Systemic Lupus Erythematosus (SLE).

INTRODUCTION

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease and its etiology has not been yet not fully clarified. SLE clinical manifestations range from mild to severe presentations and can vary from different organ manifestations to autoantibody production¹.

SLE is a complex and multifactorial disorder, with participation of genetics and environmental factors. In last years, some studies have suggested the possible role of vitamin D in the susceptibility to SLE development^{2,3}. Vitamin D is a hormone produced in the skin and metabolized in the kidneys to the active form, 1.25-dihydroxyvitamin D3 (1.25(OH)2D3)³ and its primary function is calcium homeostasis and bone metabolism^{2,3}. However, recently, vitamin D has been reported as a pleiotropic regulator of human physiology, having a role in cancer chemoprevention, and playing a role in cardioprotection and immune system modulation^{2,3,4}.

Activated vitamin D (1.25(OH)2 D3) exerts its biological action though linkage with Vitamin D Receptor (VDR)³. 1.25(OH)2 D3 blocks B cell differentiation and proliferation, enhances chemotactic and phagocytic capacity of macrophages, inhibits Dendritic Cells (DC) maturation, and modulates DC-derived cytokine and chemokine expression. In addition, vitamin D affects T cells response, inhibits production of Th1 and Th17 cytokines. Moreover this hormone reduces Th induction of immunoglobulin production by B cells³.

Many studies demonstrate importance of association between genetic polymorphisms and susceptibility to develop SLE, including immunological response and clinical symptoms development⁵. The *VDR* gene is located on chromosome 12q13.11 and contains several (SNPs), some of which modulate VDR activity. The most commonly studied VDR SNPs are rs10735810/rs2228570 (*FokI*) situated at exon 2, rs11568820 (*Cdx-2*) at exon 1e and three SNPs in linkage disequilibrium, namely rs1544410 (*BsmI*) located in intron 8, rs731236 (*TaqI*), and rs7975232 (*ApaI*), the last being a SNP situated in exon 9 and intron 9⁶. Recently, several studies have demonstrated the role of *VDR* SNPs in the development of SLE and its clinical manifestations; however, these results are variable between different cohorts⁷.

In despite of several existing SNPs, only 5 of them have been better studied. In the present work, we looked for new SNPs of *VDR* implicated on SLE. Therefore, we tested the association of the five Tag SNPs (rs11168268, rs2248098, rs1540339, rs4760648 and rs3890733), enclosing most of *VDR* gene sequence and tagged 48 *VDR* SNPs, including of the most studied polymorphisms (*TaqI*, *BsmI*, *ApaI*), with the aim of investigating possible

associations with SLE susceptibility as well as its clinical manifestations and irreversible organ damage in a Northeast Brazilian population.

SUJECTS AND METHODS

Patients and controls

A case-control study was performed in 127 SLE patients and 138 healthy individuals. The patients were selected from the Division of Rheumatology at Clinical Hospital of Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil, according the American College of Rheumatology Classification⁸. All SLE patients were females with mean age 37.4 years $\pm$ 11.9 SD. Clinical manifestations of SLE patients are shown in table 1. We also performed the evaluation of Systemic Lupus International Collaborating Clinics American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus (SLICC/ACR-DI)⁹ of SLE patients, which is shown in table 2.

The patient group was classified as European 28 (22.2%) and African-derived 102 (77.8%), according phenotypic characteristics of individuals and ethnicity data from parents/grandparents reported by the participants. These classification criteria that are used in Brazil are well documented and have been assessed by different groups in previous studies^{10,11}. The control group consisted of 138 female healthy individuals (mean age 38.9 $\pm$ 13.6) coming from the same geographic area of the patients. Caucasian descendent represented 26.1% and African-derived individuals 73.9%. Individuals with clinical manifestations and/or family history of autoimmunity were excluded of the control group. The present study was previous approved by the local ethics committee (CAAE: 03065312.3.0000.5208).

DNA extraction, SNPs Selection and VDR genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using DNA Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) according to manufacturer's protocol.

Polymorphisms were selected using the SNPBrowser software 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) and HapMap database (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Tag SNPs (s11168268, rs2248098, rs1540339, rs4760648 and rs3890733) had at least 10% Minimum Allele Frequency (MAF) and covering the main regions of *VDR* gene. Genotyping was performed with commercially available fluorogenic allele specific probes (Taqman Probes, Applied Biosystems, Foster City, CA) using the ABI7500 Real Time PCR platform

(Applied Biosystems, Foster City, CA). Allelic discrimination followed as recommended by the manufacturer and analyzed using the SDS software 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Statistical Analysis

Allele and genotype frequencies and Hardy-Weinberg equilibrium were calculated by using the SNPStats tool (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>). Statistical significance of difference in allele and genotype frequencies was calculated by Fisher's exact test. The open-source R package (www.r-project.org) was used for all statistical analyses. Haploview Software (version 4.2) was used for haplotype associations and Linkage disequilibrium (LD).

RESULTS

The *VDR* allelic and genotypic frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium in SLE patients and controls, except the Tag SNP rs3890733.

In order to determine the possible association of *VDR* polymorphisms with SLE, we compared the SNPs frequency distribution between SLE patients and controls. The frequencies distribution of genotypes differed significantly between patients and controls for TagSNPs rs11168268 (A>G) and rs2248098 (A>G). The allele G of TagSNP (rs11168268) was more frequent in SLE patients in relation to controls conferring increased risk to disease development (OR = 1.55; IC = 1.07-2.23; $p = 0.010$) (table 3). In the same way, genotype G/G of this SNP was also associated with risk for SLE development (OR = 2.72; C.I. = 1.32-5.59; $p = 0.008$) (table 3). However, the allele G of rs2248098 was protective factor for disease development (OR = 0.66; CI = 0.46-0.94; $p = 0.01$) as well as genotype G/G (OR = 0.44; C.I. = 0.22-0.88, $p = 0.02$) and genotype A/G (OR = 0.46; IC = 0.25 – 0.83; $p = 0.010$). The others *VDR* TagSNPs tested were not associated with SLE susceptibility.

Haplotype analysis was performed to assess linkage disequilibrium among the tested TagSNPs. Linkage disequilibrium (LD) for the *VDR* assessed polymorphisms was observed between rs11168268 and rs2248098 ($D' = 0.86$) suggesting combined genotype (Figure 1). No LD was observed for others TagSNPs tested.

We also evaluated the possible association of *VDR* gene polymorphisms with clinical manifestations of SLE patients. We observed genotype association with nephritis and serositis. The genotype AG (OR = 0.31; CI = 0.11-0.80; $p = 0.01$) and GG (OR = 0.36; CI = 0.15-0.84; p -value = 0.01) (rs11168268), genotype C/T (OR = 0.45; CI = 0.22-0.93; p -value = 0.02) (rs1540339) were associated with protection for nephritis development in SLE

patients. Unlike, genotype A/G at SNP rs2248098 was a risk factor for nephritis (OR = 2.42; CI= 1.17-4.97; p-value = 0.01). Another interesting data was observed for SNP rs3890733 and serositis, showing the genotype T/T protective factor for this clinical manifestation (OR = 0.11; CI = 0.002 – 0.81; p = 0.01) (Table 4).

Finally, we verified association between *VDR* gene polymorphisms with irreversible organ damage thought SLICC/ACR-DI score. This association was evaluated through presence (score ≥ 1) or absence (score = 0) of irreversible organ damage and its relation with *VDR* polymorphisms. Genotype CT+TT (dominant model) of rs3890733 (C>T) was associated with a high risk at least one irreversible organ damage (OR= 2.25; C.I.= 1.10-4.61; p= 0.03) (table 5). The others *VDR* TagSNPs tested were not associated with irreversible organ damage.

DISCUSSION

In recent years, the role of vitamin D have been highlighted, including its importance in the regulation of immune system¹² and, since vitamin D exerts its effects through the VDR, several SNPs have been studied in *VDR* gene with the purpose to investigate their relation with SLE susceptibility and clinical manifestations, however, the results are quite discordants⁷.

So we evaluated the association of 5 *VDR* Tag SNPs, covering the main gene regions and tagged 48 *VDR* SNPs including of the most studied polymorphisms (*TaqI*, *BsmI*, *ApaI*) with the susceptibility for SLE and its clinical manifestations. The TagSNP rs11168268 (A>G), evaluated in this work, covers these polymorphisms that may have potential to influence the stability of mRNA¹³.

We identified association between TagSNPs rs11168268 and rs2248098 and SLE susceptibility. It is known that nucleotide changes in the *VDR* gene may affect stability, quantity, activity of VDR protein and rate of VDR mRNA¹⁴. Thus, SNPs can modify the VDR protein and alter its interaction with active vitamin D, interfering in the actions of vitamin D in the immune system.

The association between *VDR* gene polymorphisms (*BsmI*, *TaqI*, *ApaI*, *FokI*) and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis¹⁵, Cronh's disease, ulcerative colitis¹⁶, Type 1 Diabetes¹⁷ and thyroid autoimmune disease¹⁸ has been investigated by meta-analysis with different results. According these works, the follow diseases were associated with *VDR* polymorphisms: rheumatoid arthritis (*FokI*); Ulcerative colitis (*FokI* and *TaqI*); thyroid

autoimmune disease (*BsmI* and *TaqI*); Type 1 diabetes (*ApaI* and *BsmI*); Crohn's disease (*ApaI* and *TaqI*). These differences may be due to group size, gene-gene interactions, and environmental factors.

This is a first description of association between *VDR* polymorphisms and SLE susceptibility in a Brazilian population. Two previous studies were performed by Azevêdo Silva et al.¹⁰ and Monticielo et al.¹¹ in Southeast and South of Brazil respectively. On either studies no association was observed with SLE susceptibility, however Azevêdo Silva J et al.¹⁰ showed association with cutaneous manifestations, arthritis, immunological alterations and antibody anti-DNA, while Monticielo et al.¹¹ observed association with 25-hydroxi-vitamin D levels. Azevêdo Silva J et al. and Monticielo et al. showed ethnicity distribution of approximately 76% (European) and 24% (African-derived). In comparison, our study had European (22.2%) and African-derived (77.8%). Thus, probably, the divergence of results between the present study and the others in Brazil may be due to differences in ethnic background beyond environmental factors of the Brazilian regions.

The city of Recife, in the Brazilian state of Pernambuco, where the investigation was carried out, has tropical, warm and humid climate, with high insolation indices throughout the year. Despite of the geographical location and climate characteristics, Fragoso et al.¹⁹ described high prevalence of vitamin D insufficiency/deficiency in this population of SLE patients. Once vitamin D receptor may interfere in the vitamin D levels¹¹, we hypothesized that genetic polymorphisms could be one explanation for vitamin D deficiency in this population of SLE patients.

So far there are no studies performed in Africa, South America (except Brazil), North America or Central America about *VDR* gene polymorphisms and SLE^{7, 20, 21}. In a meta-analysis performed for Mao S and Huang S (2014)⁷ *BsmI* B and *FokI* F polymorphisms alleles were reported as a genetic marker for SLE in Asian patients.

Up to now, only Huang et al. (2002)²², Ozaki et al. (2000)²³ and Luo et al (2012)²⁴ studying patients from Taiwan, Japan and China observed association of *VDR* SNPs (*BsmI* and *FokI*) with SLE development. So, the present study is the first to observe association of *VDR* SNP (rs11168268 (A>G)) and increased risk for SLE development outside of Asia. It's important to remember that rs11168268 covers the region where are located the main *VDR* polymorphisms studied: *BsmI*, *TaqI* and *ApaI*. Interesting, we also showed an association of SNP rs2248098 (A>G) as a protective factor for SLE. We emphasize that rs2248098 is not

tagging for SNPs previous associated with SLE, suggesting a participation of unknown SNPs in SLE susceptibility.

Renal involvement is common in SLE, since an abnormal urinalysis is present in a large proportion of patients at the time of diagnosis²⁵. Until 75 percent of patients develop nephritis and some of them may present reversible loss of renal function or chronic renal disease²⁶. Our results also showed an important association between TagSNPs tested with lupus nephritis (rs11168268, rs2248098, rs1540339). The rs2248098 and rs1540339 cover intron regions of *VDR* gene that are not associated with well-recognized SNPs. Although these possible unrecognized SNPs are in an intron region, they can be in linkage disequilibrium with a functional SNP in the same gene.

Only Ozaki et al. (2000)²¹ studying 58 Japanese patients with SLE (53 females and 5 males) have also verified association between *VDR* polymorphisms and SLE nephritis. They postulated that the differentiation of *VDR* genotypes may trigger breakdown of the cytokine relationship directly or indirectly, and may be associated with the pathogenesis of SLE and lupus nephritis²¹.

Studies performed in vitro have demonstrated that vitamin D inhibits T cell proliferation and leads to a reduced production of interferon-gamma, interleukin-2 (IL-2), IL-6, IL-12, IL-23 and IL-17. Moreover, the immunosuppressive activity of 1.25(OH)2D3 is demonstrated by an inhibition in the maturation, differentiation, activation, and survival of dendritic cells, leading to T cell hyporesponsiveness. Most biological activities of vitamin D are mediated by the VDR, which have been found in monocytes, macrophages, dendritic cells, and effector/memory T cells²⁷⁻³⁰. Thus, genetic variation on the *VDR* gene could lead to significant receptor dysfunction, which could affect cell proliferation and the immune response by two ways: increasing the transcription level of VDR (receptor more activated), causing a immunosuppression action, protecting for SLE and nephritis; or by decrease receptor activity, with low transcription levels and increased risk for SLE and renal disease. So, VDR could modulate immune system and an individual's susceptibility to developing SLE and nephritis.

Finally, we analyzed the possible association of *VDR* gene polymorphisms and SLE irreversible organ damage. We used the SLICC/ACR-DI for this purpose. This index has prognostic value and can identify irreversible organ damage caused by SLE itself, associated comorbidities, or pharmacologic treatment³¹. Twelve system/organs were evaluated to obtain the final score^{9,31}. The rs3890733 was associated with high risk at least one irreversible organ

damage, however these data should be interpreted with caution as the frequencies observed for this *VDR* polymorphism were not in Hardy-Weinberg equilibrium. It is possible that new mutations, or a selective advantage of one allele over another may have influenced Hardy-Weinberg equilibrium for this SNP. We did not find another association of *VDR* gene polymorphisms and irreversible organ damage.

CONCLUSION

VDR gene polymorphisms are associated with SLE susceptibility (rs11168268 and rs2248098), lupus nephritis (rs11168268, rs2248098 and rs1540339) and severity of disease (rs3890733) in the Northeastern Brazilian population. Our results suggest a possible implication of *VDR* gene for SLE development and nephritis. Others studies, with different populations and functional studies should be performed for elucidate the role of polymorphisms in the *VDR* gene in the SLE etiopathogenesis.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Brazilian funding agencies: Capes, CNPq and FACEPE.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interests.

REFERENCE

1. Li PH, Hing W, Wong S, et al. Relationship between autoantibody clustering and clinical subsets in SLE: Cluster and association analyses in Hong Kong Chinese. *Rheumatology (Oxford)* 2013; 52:337-45.
2. Maruotti N, Cantatore FP. Vitamin D and the immunesystem. *J Rheumatol* 2010; 37:491–495.
3. Marques CDL; Dantas AT; Fragoso TS, et al. The importance of vitamin D levels in autoimmune diseases. *Rev Bras Reumatol.* 2010; 50(1):67-80.
4. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, et al. *Genetics and biology* 2004.
5. H.-S. Lee and S.-C. Bae, “What can we learn from genetic studies of systemic lupus erythematosus? Implications of genetic heterogeneity among populations in SLE,” *Lupus* 2010; 19(12):1452-9.
6. Mostowska A, Lianeri M, Wudarski M, et al. Vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI and TaqI polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep* 2013; 40:803-10.
7. Mao S, Huang S. Association between vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI and TaqI polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Rheumatol Int.* 2014; 34(3):381-8.
8. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725.
9. Gladman D, Glinzler E, Goldsmith C, et al: The development and initial validation of the Systemic lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 363-78.
10. de Azevêdo Silva J, Monteiro Fernandes K, Três Pancotto JA, et al. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus clinical manifestations. *Lupus* 2013; 22(11):1110-7.
11. Monticielo OA, Brenol JC, Chies JA, et al. The role of BsmI and FokI vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2012; 21(1):43-52.
12. Deluca HF, Cantorna MT Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J* 2001; 15:2579-85.
13. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994; 367(6460):284–87.
14. Ogunkolade BW, Boucher BJ, Prahl JM, et al. Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes.* 2002; 51(7):2294-300.

15. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, et al. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2011; 38:3643-51.
16. Xue LN, Xu KQ, Zhang W, et al. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease: a meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19(1):54-60.
17. Pani MA, Knapp M, Donner H, et al. Vitamin D Receptor Allele Combinations Influence Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes in Germans. *Diabetes*. 2000; 49:504-7.
18. Feng M, Li H, Chen SF, et al. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and risk of autoimmune thyroid diseases: a meta-analysis. *Endocrine*. 2013; 43(2):318-26.
19. Fragoso TS, Dantas AT, Marques CD, et al. 25-Hydroxyvitamin D3 levels in patients with systemic lupus erythematosus and its association with clinical parameters and laboratory tests. *Rev Bras Reumatol* 2012; 52(1):60-5.
20. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, et al. Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2011; 38(6):3643-51.
21. Xiong J, He Z, Zeng X, et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol*. 2013 Dec 9.
22. Huang CM, Wu MC, Wu JY, et al Association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2002; 11:31-4.
23. Ozaki Y, Nomura S, Nagahama M, et al. Vitamin-D receptor genotype and renal disorder in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Nephron* 2000; 85:86-91.
24. Luo XY, Wu LJ, Chen L, et al. The association of vitamin D receptor gene ApaI and BsmI polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2012; 2:131-5.
25. Borba EF, Araujo DB, Bonfá E, et al. Clinical and immunological features of 888 Brazilian systemic lupus patients from a monocentric cohort: comparison with other populations. *Lupus* 2013; 22(7):744-9.
26. Ortega LM, Schultz DR, Lenz O, et al. Review: Lupus nephritis: pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions. *Lupus* 2010; 19(5):557.
27. Alroy I, Towers TL, Freedman LP. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol* 1995; 15:5789-99.
28. Penna G, Adorini L. 1 Alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 2000; 164:2405-11

29. Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 2000. 374:334-8.
30. Daniel C, Sartory NA, Zahn N, et al. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324:23-33.
31. Sella, EMC; Sato, EI. Avaliação do índice de danos permanentes através de SLICC/ACR-DI em pacientes com mais de cinco anos de diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol* 2004; 44(2) 115-22.

Table 1. Clinical and laboratorial characteristics of 127 SLE patients

Clinical/laboratorial characteristics	n (%)
Photosensitivity	80 (62.9%)
Malar Rash	77 (60.6%)
Discoid Rash	22 (17.3%)
Oral ulcers	27 (21.2%)
Serositis	28 (22.0%)
Arthritis	92 (71.4%)
Neuropsychiatric disorder	11 (8.6%)
Nephritic disorder	63 (49.6%)
Hematological alterations	87 (68.5%)
Antinuclear Factor positive (FAN)	128 (100%)
Antibody anti DNA (anti ds-DNA)	32 (25.1%)

Table 2. SLICC/ACR-DI score from SLE patients

SLICC	Patients (n=127)	Percentage (%)
0	65	51,18%
1	26	20,47%
2	19	14,96%
3	8	6,30%
4	8	6,30%
5	1	0,79%

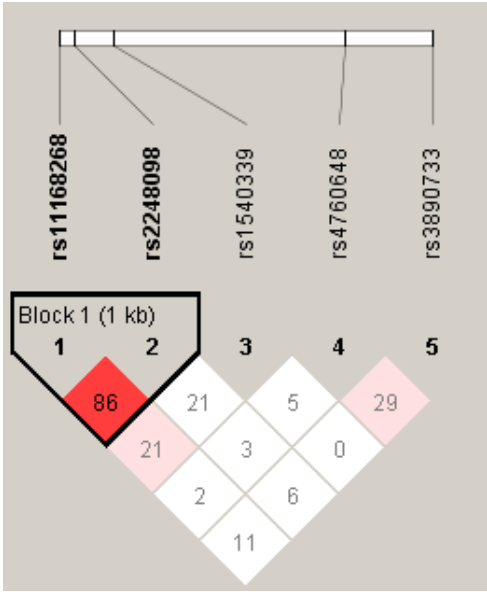


Figure 1 – Haplotype graphical representation showing the linkage disequilibrium among the polymorphisms for rs11168268 and rs2248098.

Table 3: Alleles and Genotypes of the TagSNPs associated with SLE susceptibility

VDR TagSNPs	SLE patients n= 127	Healthy Controls n= 138	OR, CI, <i>p-value</i>
rs11168268			
Allele			
A	135 (53.0%)	176 (64.0%)	1.00
G	119 (47.0%)	100 (36.0%)	1.55; 1.07-2.23; 0.01
Genotype			
AA	41 (32.3%)	54 (39.1%)	1.00
AG	53 (41.7%)	68 (49.3%)	1.03; 0.6-1.77; 0.01
GG	33 (26.0%)	16 (11.6%)	2.72; 1.32-5.59; 0.008
rs2248098			
Allele			
A	143 (56.0%)	127 (46.0%)	1.00
G	111 (44.0%)	149 (54.0%)	0.66; 0.46-0.94; 0.01
Genotype			
AA	43 (33.9%)	26 (18.8%)	1.00
AG	57 (44.9%)	75 (54.4%)	0.46; 0.25-0.83; 0.01
GG	27 (21.3%)	37 (26.8%)	0.44; 0.22-0.88; 0.02

Table 4: SLE Clinical manifestations associated with genotypes of VDR TagSNPs

	MODEL	GENOTYPE	OR, CI, p-value
Nephritis			
rs11168268 (A>G)	Codominant	A/G	0.31; 0.11-0.80; 0.01
rs11168268 (A>G)	Codominant	G/G	0.36; 0.15-0.84; 0.01
rs2248098 (A>G)	Overdominant	A/G	2.42; 1.17-4.97; 0.01
rs1540339 (C>T)	Overdominant	C/T	0.45; 0.22-0.93; 0.02
Serositis			
3890733 (C>T)	Codominant	T/T	0.11; 0.002-0.81; 0.01

Table 5: Association between the presence of organ damage and Tag SNP rs3890733.

<i>VDR</i> TagSNPs	No organ damage	Organ damage	OR; CI; <i>p</i> -value
rs3890733			
Genotype*			
CC	39 (60.0%)	24 (40.0%)	2.25; 1.10; 0.03
CT+TT	26 (40.0%)	36 (60%)	

* Dominant model

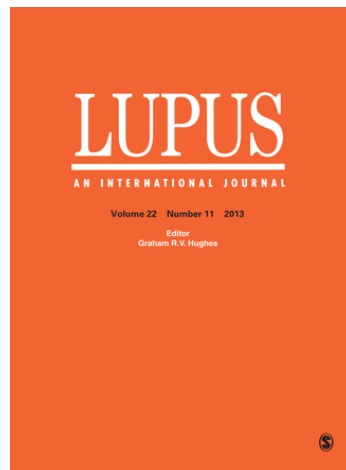
CAPÍTULO II

CAPÍTULO II – VITAMIN D RECEPTOR (VDR) POLYMORPHISMS AND SUSCEPTIBILITY TO SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS CLINICAL MANIFESTATIONS

Publicado na Revista Lupus

Lupus (2013) 22, 1110–1117.

Fator de impacto (2012): 2.783



VITAMIN D RECEPTOR (VDR) GENE POLYMORPHISMS AND SUSCEPTIBILITY TO
SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS CLINICAL MANIFESTATIONS

Jaqueline de Azevedo Silva^{1,2}, Karina Monteiro Fernandes², João Alexandre Três Pancotto³,
Thiago Sotero Fragoso², Eduardo Antônio Donadi⁴, Sergio Crovella^{1,2},
Paula Sandrin-Garcia^{1,2}

1. Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
2. Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
3. Federal University of Espírito Santo, UFES, São Mateus, Espírito Santo, Brazil.
4. Division of Clinical Immunology, Department of Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP Brazil.

Corresponding author:

Paula Sandrin-Garcia;

e-mail: paula.sandrin@ufpe.br

Department of Genetics/ Federal University of Pernambuco

Av. Moraes Rego, 1235, Recife/ Brazil CEP 50760-901

Telephone / Fax 55 8121268522

Running Head: *VDR* gene polymorphisms in SLE.

Key-words: SNPs, VDR gene, SLE and SLE clinical manifestations.

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disorder with heterogeneous clinical manifestations and target tissue damage. Currently, several genes have been associated to SLE susceptibility, including Vitamin D Receptor (VDR), which is a mediator of immune responses through the action of vitamin D. Polymorphisms in *VDR* gene can impair vitamin D (D_3) function role and since SLE patients show deficient D_3 blood levels, it leads to a possible connection to the disease's onset. In our study we searched for association between *VDR* polymorphisms and risk to develop SLE, as well as disease's clinical manifestations. We enrolled 158 SLE patients and 190 Southeast Brazilian healthy controls, genotyped for 5 Tag SNPs, covering most of the VDR gene region. We found association between *VDR* SNPs and SLE for the following clinical manifestations: rs11168268 and cutaneous alterations ($p = 0.036$), rs3890733 ($p=0.003$) rs3890733 and arthritis ($p=0.001$), rs2248098 and immunological alterations ($p=0.040$), rs4760648 and Antibody anti ds-DNA ($p=0.036$). No association was reported between *VDR* polymorphisms and SLE susceptibility.

KEYWORDS: SNPs, VDR, SLE and SLE clinical manifestations.

INTRODUCTION

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a complex autoimmune disorder displaying heterogeneous clinical manifestations. The heterogeneity of SLE clinical characteristics is a confounding factor for diagnosis, therefore 4 out of the 11 criteria defined by the American College of Rheumatology are simultaneously required for the formal diagnosis (1). SLE phenotype can range from different organ manifestations to autoantibody production (2). The most developed phenotypes are related to cutaneous alterations, affecting up to 85% of SLE patients (3). Lupus nephritis is a common clinical feature in SLE patients and the frequency of renal involvement is particularly high in juvenile-onset SLE, ranging from 50% to 80% in most cohorts described to date and biopsy from SLE patient's kidney demonstrated some degree of renal involvement in almost all patients (4,5). Arthritis and arthralgia are another common manifestation in many systemic autoimmune diseases and affect 40-60% of SLE patients, usually non-deforming (4,6).

Vitamin D is a hormone produced in the skin and metabolized within the kidneys to $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 (calcitriol), the active form of vitamin D (7). Vitamin D classic function is to regulate calcium homeostasis and thus bone formation, however, D_3 also displays immunomodulatory effect, acting through the vitamin D receptor (VDR) (8). Since VDR was identified over three decades ago, more than 50 targets have been described, providing a broader role for vitamin D function (9). The general immunologic effect of D_3 includes: down regulation of Th1 immune responses, modulation of dendritic cells differentiation, depressing activated B cells proliferation, up regulation of regulatory T cells and particularly, preserving immune response (10). Deficient levels of D_3 have been associated to SLE in several populations, as well as to its morbidity and mortality in multiple chronic diseases (10,11).

VDR gene, located at 12q13.1, is highly polymorphic, with more than sixty described polymorphisms, including eight protein-encoding exons (exons 2-9) and six untranslated exons (exons 1a-1f), which are under alternative splicing, eight introns and two promoter regions (12,13). Polymorphisms in *VDR* sequence may change the gene function and so D₃ action. Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *VDR* gene have been described so far, but mainly four (namely *TaqI*, *BsmI*, *ApaI* and *FokI*), are intensively studied (13). Despite the fact that *BsmI*, *TaqI* and *ApaI* have no functional role, the reported association rely on linkage disequilibrium (12). Hence, the association studies with *VDR* polymorphisms and SLE susceptibility have been performed in different populations with controversial results (11,14,15).

In our study we selected five Tag SNPs (rs11168268, rs2248098, rs1540339, rs4760648 and rs3890733), covering most of *VDR* gene sequence, and tagging some of the most studied polymorphisms (*TaqI*, *BsmI*, *ApaI*) with the aim of investigate possible associations with SLE susceptibility as well as its clinical manifestations in a Southeast Brazilian population.

SUBJECTS AND METHODS

Patients and Controls

We enrolled 158 SLE patients, 147 (93%) females and 11 (7%) males, mean age 37.8 years $\pm$ 11.9 SD, recruited from the Division of Clinical Immunology, University Hospital of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (SP, Brazil). The diagnosis of SLE was performed according to the criteria defined by the American College of Rheumatology (1). SLE patients were stratified according clinical manifestations as showed in Table 1. The patient group was classified as European 120 (76%) and African-derived 38

(24%), according phenotypic characteristics of individuals and ethnicity data from parents/grandparents reported by the participants.

The control group consisted of 190 healthy unrelated individuals, 90 (47%) females and 100 (53%) males, mean age 36.47 years $\pm$ 10.96 years, from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. European and African-derived individuals represented 72% (137) and 28% (53), respectively. We used as exclusion criteria for the control group, the presence of clinical manifestations and/or family history of autoimmunity. Genotyping for HLA-A, B, C, DR and DQ were performed in order to exclude the presence of HLA risk haplotype in the control group. The present study was previous approved by the local ethics committee (CEP/HCRP/FMRP #2234/2007).

SNPs Selection and VDR genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral whole blood using a salting out procedure (16). Polymorphisms were selected using the SNPBrowser software 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) and HapMap database (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). Tag SNPs (rs11168268, rs2248098, rs1540339, rs4760648 and rs3890733) had at least 10% Minimum Allele Frequency (MAF) (Figure 1a). Genotyping was performed with commercially available fluorogenic allele specific probes (Taqman Probes, Applied Biosystems, Foster City, CA) using the ABI7500 Real Time PCR platform (Applied Biosystems, Foster City, CA). Allelic discrimination followed as recommended by the manufacturer and analyzed using the SDS software 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA)

Statistical Analysis

Allelic and Genotypic frequencies as well as Hardy-Weinberg equilibrium were calculated by using the SNPStats tool (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>). The Exact Fisher Test was applied to determine the statistical significance of all comparisons. Haploview Software (version 4.2) was used for haplotype associations. “SNPassoc” R package (R

software, version 2.12.2), developed for genetic studies, was used for evaluating the association between SNPs and SLE susceptibility (17). P-values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Allelic and genotypic frequencies for *VDR* SNPs were in Hardy–Weinberg equilibrium in SLE patients and healthy controls (HC). The frequencies distribution did not differ significantly between SLE patients and healthy controls (HC) as shown in Table 2. Haplotype analysis was performed to assess linkage disequilibrium among the tested Tag SNPs. No linkage disequilibrium for the *VDR* assessed polymorphisms was observed, except for Tag SNPs with rs1116828 and rs2248048 ($D' = 0.76$), suggesting combined genotypes as shown in figure 1b. The haplotype combination did not provide any association neither to SLE or its clinical features susceptibility (data not shown). When assessing *VDR* polymorphisms and altered risk for SLE clinical manifestations and laboratorial profiles we report association to: Cutaneous alterations for G/G genotype (rs11168268) (OR = 3.01, $p = 0.036$) and C/T genotype (rs3890733) (OR = 0.36, $p = 0.003$); Arthritis for T/T genotype (rs3890733) (OR = 17.05, $p = 0.001$); Immunological alterations for G/G genotype (rs2248098) (OR = 2.82, $p = 0.040$) and Antibody anti ds-DNA for C/T genotype (rs4760648) (OR = 0.37, $p = 0.036$). We also report a trend of association for *VDR* polymorphisms and nephritic disorders (OR = 0.37, $p = 0.041$) and photosensitivity (OR = 0.33, $p = 0.046$). The associations reported with *VDR* polymorphisms and clinical manifestations are depicted in Table 3.

Regarding the SLE clinical manifestations stratification considering ethnicity and gender, we observed association in African-derived patients, indicating protection to cutaneous (OR = 0.36, CI = 0.16-0.82, $p = 0.009$) and hematological alterations (OR = 0.36,

CI = 0.15-0.81, $p= 0.009$), when compared to European-derived patients, as reported in Table 4.

DISCUSSION

The first report suggesting that vitamin D deficiency was associated in SLE patients came over three decades ago and since then, several studies in different populations associated low vitamin D levels to the disease (18–20). Additionally, it has been suggested that insufficient vitamin D levels also exacerbate the immunological abnormalities seen in SLE patients(20). Since VDR is the main regulator of vitamin D action, polymorphisms in the gene region may compromise its role (21). In the present work we performed an association study with 5 Tag SNPs, covering the whole the gene region, and SLE susceptibility, as well as its clinical features in a Southeast Brazilian population. We also evaluated association stratifying SLE patients for clinical manifestations, gender and ethnicity.

Association studies with *VDR* polymorphisms and autoimmune disorders, including SLE susceptibility, have been performed in different populations with heterogeneous results. Our findings did not provide evidence of association between *VDR* polymorphisms and SLE susceptibility in Southeast Brazilian population. Our results are in accordance to the ones from Thai, Iranian, Portuguese, Tunisian and Chilean populations where no association was reported (22–26). However, in some populations the association of *VDR* polymorphisms to several immune disorders, has been reported, such as in Chinese, Japanese, Greek, German and Brazilian population (14,27–30), evidencing the importance of replica studies in populations with diverse genetic background.

When considering *VDR* SNPs and SLE clinical manifestations the following associations have been found: cutaneous and immunological alterations (rs11168269, rs3890733 and rs2248098) antibody anti-DNA (rs4760648), and arthritis (rs3890733). We

also found a trend of association between *VDR* polymorphisms and nephritic disorders (rs4760648) and photosensitivity (rs4760648). *VDR* is expressed in several types of cells and a recent review by Wang et al, 2012 (31), described *VDR* distribution in tissues and the specific cell types throughout the body. *VDR* is also selectively expressed in the skin epithelial cells and seems to be restricted to the nuclei (31). A study performed by Hutchinson, et al. (32), assessed *VDR* variants and the risk to Malignant Melanoma (MM), a type of skin cancer. The study was based on the data showing that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (the hormonal derivative of vitamin D_3 and the ligand of the *VDR*) has anti-proliferative and pro-differentiation effects in *VDR*-expressing cell types. Since MM cells express *VDR* they found association at *FokI* *VDR* polymorphic site with altered risk of MM (32). Skin alterations are involved in up to 85% of SLE cases and photosensitivity, one of the most common alterations, resulting from ultraviolet light exposure and causing a macular or erythematous rash (3). When the keratinocytes are exposed to ultraviolet light they become apoptotic due to DNA damage and release nuclear material, which is not efficiently cleared in SLE patients, causing immune response triggering (33). Moreover, vitamin D is able to reduce the UV-induced DNA damage and suppress cutaneous immunity, so vitamin D displays a key role in maintain cell integrity after UV light exposure (34).

Autoantibodies for double strand DNA (ds-DNA) is a widely known marker of SLE and the pathogenic potential is expressed as a correlation between the autoantibody titer and disease activity (remissions and exacerbations) (35). Here we report association of *VDR* rs4760648 polymorphisms and anti-dsDNA. A recent study correlated vitamin D levels to SLE activity and anti-dsDNA titers (36). The authors reported that deficiency in D_3 levels are related to increased SLE activity and anti-DNA titers, reinforcing the immune modulator role of D_3 in chronic diseases (36). Besides immunologic activity, vitamin D has a crucial role in calcium regulation and bone metabolism (37). Arthritis is a common feature in SLE patients

and may occur in approximately 50% of patients, usually affecting the small joints of the hands, wrists, and knees, commonly symmetric. Differently from rheumatoid arthritis (RA), arthritis in SLE does not induce severe bone damage and erosions. However, is often accompanied by pain and swelling (38). Most of the associations with *VDR* polymorphisms regard rheumatoid arthritis and little attention has been devoted to SLE arthritis (37). We report association between *VDR* rs389073 polymorphism and increased risk for SLE arthritis (OR=17.05, $p= 0.001$). Nevertheless, the association with augmented risk to develop SLE arthritis should be interpreted with caution as the frequencies observed for this *VDR* polymorphism were not in Hardy-Weinberg equilibrium.

Herein we also reported a trend of association between *VDR* polymorphisms and nephritic disorders, one of the most frequent and damaging clinical feature in SLE (5). In 2002, Luo et al (14), investigated the association of *VDR* polymorphism *BsmI* with SLE susceptibility and its clinical manifestations. The authors associated the *VDR* *BsmI* polymorphism B allele to the development of lupus nephritis and down-regulation of *VDR* mRNA expression in SLE patients (14). Li et al (2012) conducted a study assessing individual and clustered autoantibodies and their roles as disease's manifestations specific markers. The authors concluded that anti-dsDNA was associated with renal disorder and not to any other clinical manifestations. Noteworthy, the deposition of anti-dsDNA is the main pathogenic event in SLE renal compromising (2). Regarding *VDR* haplotypes, we did not find association of genotype combinations neither to SLE nor to its clinical manifestations. Since the Tag SNPs assessed in our study did not show significant linkage disequilibrium among them no associations could be inferred regarding SLE and its clinical features. However, even though the formation of haplotypes blocks in *VDR* gene is widely studied with *BsmI*, *FokI* and *TaqI* most of the association studies are controversial and have not been proved yet (23,39–42).

When assessing clinical manifestation considering ethnicity and gender, the European-derived patients presented increased risk for cutaneous and hematological alterations in comparison to African-derived. Our association is reasonable once European-derived presents less melanin than African –derived patients and the melanin acts as a natural optical strainer protecting the skin cells against UV radiation (43). However, it is important to comment that the ethnic classification adopted in the present study was based on phenotypic characteristics of individuals and ethnicity data of parents/grandparents is often accepted in Brazil, even though, European- or African-derived groups can present a certain degree of admixture (44,45). Our results are in agreement to Sestak et al. (46), which assessed different ethnical groups of SLE patients (European, African and Hispanic) and reported that African-derived had lower frequencies of cutaneous and immunological alterations and nephritic disorders, when compared to European and Hispanic-derived patients (46).

Finally, even though we acknowledge the limited size of our sample, that may have lacked the ability to find some possible association between *VDR* polymorphisms and SLE. However, several *VDR* SNPs in this study have been found associated with SLE clinical manifestations and we believe that this may reinforce a true association between *VDR* SNPs and clinical manifestations, suggesting that *VDR* should be implicated in SLE etiopathogenesis. Thus, further studies in populations with different ethnical background and larger number of subjects are necessary to reinforce our results and to clarify the role of *VDR* polymorphisms in SLE.

CONCLUSION

VDR gene polymorphisms are associated to particular SLE clinical manifestations in a Southeast Brazilian population. Our results provide evidence for considering *VDR* as a potential marker in disease's activity.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Brazilian funding agencies: Capes, CNPq and FACEPE.

CONFLICT OF INTEREST

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

REFERENCES

1. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; 9:1725.
2. Li PH, Hing W, Wong S, Lee TL, Lau CS, Chan TM, et al. Relationship between autoantibody clustering and clinical subsets in SLE : cluster and association analyses in Hong Kong Chinese. *Rheumatology (Oxford)* 2012;1–9.
3. Uva L, Miguel D, Pinheiro C, Freitas JP, Marques Gomes M, Filipe P. Cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. *Autoimmune diseases.* 2012; 1-15.
4. Cojucaru M, Cojucaru IM, Silosi I, Vrabie CD. Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Maedica – A journal of Clinical Medicine.* 2011; 4:330-6.
5. Borchers AT, Leibushor N, Naguwa SM, Cheema GS, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Lupus nephritis: A critical review. *Autoimmun Rev.* 2012; 2:174-94.
6. Lira, E, Bezerra, M, José, M, Vilar, P, Fátima, ODE, Barbosa, C. Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES): Perfil Clínico-Laboratorial dos Pacientes do Hospital Universitário Onofre Lopes (UFRN-Natal/Brasil) e Índice de Dano nos Pacientes com Diagnóstico Recente. *Rev Bras Reumatol.* 2005; 84: 339–342.
7. Norman AW. Sunlight, season, skin pigmentation, vitamin D, and 25-hydroxyvitamin D: integral components of the vitamin D endocrine system. *Am J Clin Nutr* 1998; 67:1108–10.
8. Nejentsev S, Cooper JD, Godfrey L, Howson JMM, Rance H, Nutland S, et al. Analysis of the vitamin D receptor gene sequence variants in type 1 diabetes. *Diabetes* 2004; 10:2709–12.
9. Qiao S-W, Iversen R, Ráki M, Sollid LM. The adaptive immune response in celiac disease. *Semin Immunopathol.* 2012; 4:523-40.
10. Singh A, Kamen DL. Potential Benefits of Vitamin D for Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Dermato-Endocrinol.* 2012; 2: 146-51.
11. Alonso-Perez E, Suarez-Gestal M, Calaza M, Witte T, Papasteriades C, Marchini M, et al. Association of systemic lupus erythematosus clinical features with European population genetic substructure. *PloS One* 2011; 12 :e29033.
12. Köstner K, Denzer N, Müller CSL, Klein R, Tilgen W, Reichrath J. The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Research* 2009; 9:3511–36.
13. Zhang J, Li W, Liu J, Wu W, Ouyang H, Zhang Q, et al. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and type 1 diabetes mellitus risk: an update by meta-analysis. *Molecular and cellular endocrinol.* 2012; 1:135–42.
14. Luo XY, Wu LJ, Chen L, Yang MH, Liao T, Liu NT, Ku-Er B, Xie CM, Shi RG, Tang Z, Zhao Y, Zeng XF YG. The association of vitamin D receptor gene ApaI and BsmI polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2012; 2:131–5.

15. Abbasi M, Rezaieyazdi Z, Afshari JT, Hatef M, Sahebari M, Saadati N. Lack of association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 2010; 30:1537–1539.
16. Sambrook J, Fritsch EF. *MTM cloning. A laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
17. González JR, Armengol L, Solé X, Guinó E, Mercader JM, Estivill X, et al. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics (Oxford, England).* 2007; 5: 644–5.
18. Ruiz-Irastorza G, Egurbide MV, Olivares N, Martinez-Berriotxo A, Aguirre C. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus: prevalence, predictors and clinical consequences. *Rheumatology (Oxford, England).* 2008; 6:920–3.
19. Monticeli OA, Teixeira TDM, Chies JAB, Brenol JCT, Xavier RM. Vitamin D and polymorphisms of VDR gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2012; 10:1411-21.
20. Mok CC. Vitamin D and systemic lupus erythematosus: an update. *Expert Rev Clin Immunol.* 2013; 5:453-63.
21. Miyamoto K, Kesterson RA, Yamamoto H, Taketani Y, Nishiwaki E, Tatsumi S, et al. Structural organization of the human vitamin D receptor chromosomal gene and its promoter. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 1997; 8:1165–79.
21. Haron M and FitzGerald O. Vitamin D and its emerging role in immunopathology *Clin Rheumatol.* 2012; 31:199–202 .
23. Angel B, Santos JL, Carrasco E, Albala C, Pérez-Bravo F. Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in Chilean subjects: a case-parent study. *European journal of epidemiology.* 2004; 12:1085–7.
24. Lemos MC, Fagulha A, Coutinho E, Gomes L, Bastos M, Barros L, et al. Lack of association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Portuguese population. *Human immunology.* 2008; 2:134–8.
25. Mohammadnejad Z, Ghanbari M, Ganjali R, Afshari JT, Heydarpour M, Taghavi SM, et al. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and type 1 diabetes mellitus in Iranian population. *Molecular biology reports.* 2012; 2:831–7.
26. Sakulpipatsin W, Verasertniyom O, Nantiruj K, Totemchokchyakarn K, Lertsrisatit P, Janwityanujit S. Vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in Thai patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy.* 2006; 2:R48.
27. Ozaki Y, Nomura S, Nagahama M, Yoshimura C, Kagawa H FS. Vitamin-D Receptor Genotype and Renal Disorder in Japanese Patients with Systemic Lupus erythematosus. *Nephron.* 2000; 1:86–91.

28. Panierakis C, Goulielmos G, Mamoulakis D, Petraki E, Papavasiliou E, Galanakis E. Vitamin D receptor gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes in Crete, Greece. *Clinical Immunology*. 2009; 2:276–81.
29. Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadel KH, et al. Vitamin D Receptor Allele Combinations Influence Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes in Germans. *Diabetes*. 2000; 49:504-7.
30. Mory DB, Rocco ER, Miranda WL, Kasamatsu T, Crispim F, Dib S a. Prevalence of vitamin D receptor gene polymorphisms FokI and BsmI in Brazilian individuals with type 1 diabetes and their relation to beta-cell autoimmunity and to remaining beta-cell function. *Human immunology*. 2009; 6:447–51.
31. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Archives of biochemistry and biophysics*. 2012; 1:123–33.
32. Hutchinson PE, Osborne JE, Lear JT, Smith AG, Bowers PW, Morris PN, et al. Vitamin D Receptor Polymorphisms Are Associated with Altered Prognosis in Patients with Malignant Melanoma. *Clinical Cancer Research*. 2000; 6: 498–504.
33. Damian DL, Kim YJ, Dixon KM, Halliday GM, Javeri A, Mason RS. Topical calcitriol protects from UV-induced genetic damage but suppresses cutaneous immunity in humans. *Experimental Dermatology*. 2009; 19: e23–e30.
34. Vinh Quốc L Ng K, Nguyễn LTH. The beneficial role of vitamin D in systemic lupus erythematosus (SLE). *Clinical rheumatology*. 2012; 5:1423–35.
35. Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: More than 100 different antibodies found in SLE patients. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2004; 2:501–37.
36. Mok C, Birmingham D, Ho L, Hebert L, Song H, Rovin B. Vitamin D deficiency as marker for disease activity and damage in systemic lupus erythematosus: a comparison with anti-dsDNA and anti-C1q. *Lupus*. 2011;21:36–42.
37. Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women’s Health Study. *Arthritis and rheumatism*. 2004;1:72–7.
38. Nzeusseu TA, Galant C, Theate I, Maudoux AL, Lories RJU, Houssiau FA, et al. Identification of distinct gene expression profiles in the synovium of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 2007; 5:1579–88.
39. Ramos-Lopez E, Jansen T, Ivaskevicius V, Kahles H, Klepzig C, Oldenburg J, et al. Protection from type 1 diabetes by vitamin D receptor haplotypes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1079:327–34.
40. Karami S, Brennan P, Rosenberg PS, Navratilova M, Mates D, Zaridze D, et al. Analysis of SNPs and haplotypes in vitamin D pathway genes and renal cancer risk. *PloS One*. 2009;9:e7013.

41. Maalej A, Petit-Teixeira E, Chabchoub G, Hamad M Ben, Rebai A, Farid NR, et al. Lack of association of VDR gene polymorphisms with thyroid autoimmune disorders: familial and case/control studies. *Journal of clinical immunology*. 2008; 1:21–5.
42. Santos BR, Mascarenhas LP, Satler F, Boguszewski MC, Spritzer PM. Vitamin D deficiency in girls from South Brazil: a cross-sectional study on prevalence and association with vitamin D receptor gene variants. *BMC pediatrics*. 2012;1:62.
43. Böhm M, Wolff I, Scholzen TE, Robinson SJ, Healy E, Luger T a, et al. Alpha-Melanocyte-stimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. *The Journal of biological chemistry*. 2005; 7:5795–802.
44. Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, Bortolini MC, Alegre P. Frequency of CCR5 $\Delta\Delta$ 32 in Brazilian populations. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2006; 5:321–5.
45. Veit TD, Cordero EAA, Mucenic T, Monticelo OA, Brenol JCT, Xavier RM, et al. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2009; 5:424–30.
46. Sestak AL, Nath SK, Kelly JA, Bruner GR, James JA, Harley JB. Patients with familial and sporadic onset SLE have similar clinical profiles but vary profoundly by race. *Lupus*. 2008; 11:1004–9.

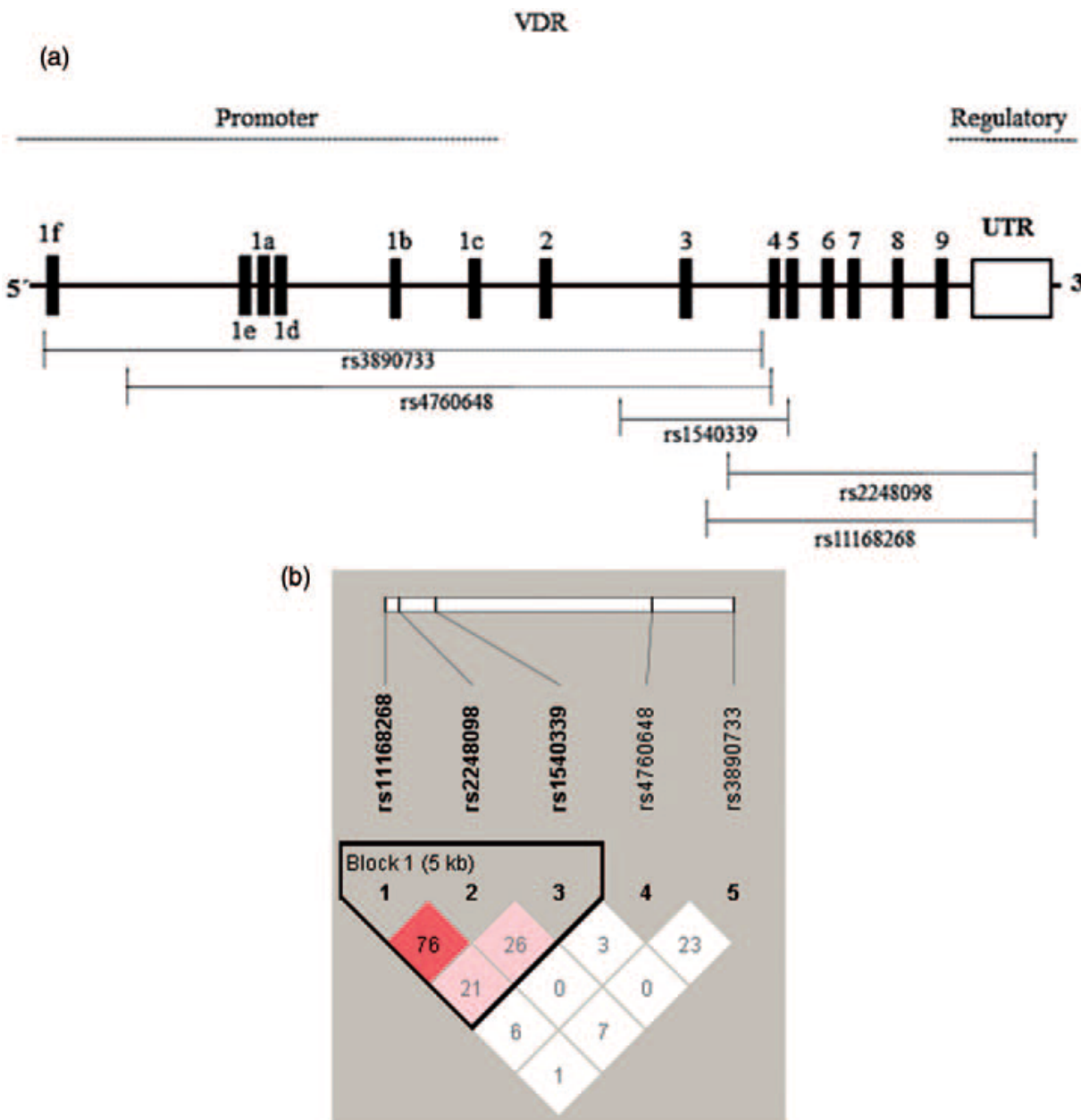


Figure 01: A *VDR* gene structure, distribution and coverage area of the tested Tag SNPs throughout the gene. B. Haplotype graphical representation showing the linkage disequilibrium among the tested polymorphisms.

Table 1 Demographical and Clinical/laboratory profiles in 158 Brazilian SLE patients

<i>Demographic and clinical/laboratories characteristics</i>	<i>SLE Patients</i>
	<i>n (%)</i>
Sex	
Male	11 (6.96%)
Female	147 (93.04%)
Ethnic Group	
European derived	120 (75.95%)
African derived	38 (24.05%)
Clinical/Laboratories Characteristics	
Cutaneous alterations	88 (55.7%)
Photosensitivity	45 (28.5%)
Arthritis	68 (43%)
Serositis	40 (25.3%)
Nephritic disorder	87 (55.1%)
Neuropsychiatric disorder	30 (19%)
Hematological alterations	84 (53.2%)
Immunological alterations	87 (55.1%)
Antinuclear Factor positive (FAN)	129 (81.64%)
Antibody anti DNA (anti ds-DNA)	34 (21.52%)
Antiohospholipid syndrome (APS)	52 (32.9%)
Raynaud phenomenon	8 (5.06%)

anti-dsDNA: anti-double-stranded DNA.

Table 2 Genotype and allele frequencies of *VDR* associated SNPs in SLE patients and healthy controls

<i>Polymorphism</i>	<i>Patients N (%)</i>	<i>Controls N (%)</i>	<i>Odds Ratio (95% CI)</i>	<i>p-value</i>
rs11168268	158	187		
Allele				
A	193 (61.07%)	220 (58.51%)	1.00	
G	123 (38.93%)	154 (41.49%)	0.91 (0.66–1.25)	0.58
Genotype				
AA	62 (39.2%)	67 (35.8%)	1.00	
AG	69 (43.7%)	86 (46%)	0.87 (0.53–1.42)	0.63
GG	27 (17.1%)	34 (18.2%)	1.10 (0.47–1.58)	0.64
rs2248098	158	188		
Allele				
G	158 (50%)	199 (52.92%)	1.00	
A	158 (50%)	177 (47.08%)	1.12 (0.82–1.53)	0.45
Genotype				
GG	39 (24.7%)	55 (29.3%)	1.00	
AG	80 (50.6%)	89 (47.3%)	1.26 (0.74–2.18)	0.37
AA	39 (24.7%)	44 (23.4%)	1.25 (0.66–2.36)	0.54
rs1540339	158	188		
Allele				
C	221 (69.94%)	242 (64.36%)	1.00	
T	95 (30.06%)	134 (35.64%)	0.78 (0.56–1.08)	0.12
Genotype				
CC	81 (51.3%)	78 (41.5%)	1.00	
CT	59 (37.3%)	86 (45.7%)	0.66 (0.42–1.04)	0.08
TT	18 (11.4%)	24 (12.8%)	0.72 (0.36–1.43)	0.38
rs4760648	158	188		
Allele				
C	159 (50.32%)	189 (50.26%)	1.00	
T	157 (49.68%)	187 (49.74%)	1.00 (0.73–1.36)	1.00
Genotype				
CC	40 (25.3%)	51 (27.1%)	1	
CT	79 (50%)	87 (46.3%)	1.16 (0.69–1.94)	0.60
TT	39 (24.7%)	50 (26.6%)	0.99 (0.55–1.79)	1.00
rs3890733	158	189		
Allele				
C	219 (69.3%)	261 (69.41%)	1.00	
T	97 (30.7%)	117 (30.59%)	0.99 (0.70–1.38)	1.00
Genotype				
CC	71 (44.9%)	93 (49.2%)	1	
CT	77 (48.7%)	75 (39.7%)	1.34 (0.86–2.09)	0.21
TT	10 (6.3%)	21 (11.1%)	0.62 (0.28–1.44)	0.32

CI = 95% confidence interval; OR = odds ratio.

Table 3 SLE patients' clinical manifestation (%) accordingly to SNPs VDR gene associated genotype

Clinical Manifestations	SNPs					
	<i>rs11168268</i>	<i>rs2248097</i>	<i>rs4760647</i>		<i>rs3890733</i>	
	G/G n=27 (%)	G/G n=39 (%)	C/T n=79 (%)	T/T n=39 (%)	C/T n=77 (%)	T/T n=10 (%)
Photosensitivity	11 (40.7)	14 (35.9)	22 (27.8)	7 (18) ^d	18 (23.4)	4 (40)
Serositis	7 (25.9)	12 (30.7)	19 (24)	10 (25.6)	17 (22.1)	1 (10)
Arthritis	11 (40.7)	17 (43.6)	24 (30.4)	14 (35.9)	35 (45.5)	9 (90) ^g
Cutaneous alterations	20 (74.1) ^a	21 (53.8)	45 (57)	22 (56.4)	34 (44.2) ^f	5 (50)
Neuropsychiatric disorder	6 (22.3)	8 (20.5)	16 (20.2)	7 (18)	12 (15.6)	3 (30)
Nephritic disorder	11 (40.7)	19 (48.7)	41 (51.9)	18 (46.2) ^e	43 (55.8)	6 (60)
Hematological alterations	18 (66.7)	17 (43.6)	42 (53.2)	18 (46.2)	42 (54.6)	5 (50)
Immunological alterations	11 (40.7)	8 (20.5) ^b	22 (27.8)	7 (18)	18 (23.4)	4 (40)
Antinuclear Factor positive (FAN)	21 (77.8)	33 (84.6)	65 (82.3)	19 (48.8)	59 (76.7)	9 (90)
Antibody anti DNA (anti ds-DNA)	7 (25.9)	5 (12.8)	13 (16.5) ^c	7 (18)	14 (18.2)	3 (30)
Antiphospholipid syndrome (APS)	5 (18.5)	11 (28.2)	19 (24)	9 (23.1)	15 (19.5)	2 (20)
Raynaud phenomenon	1 (3.7)	2 (5.1)	3 (3.8)	3 (7.7)	4 (5.2)	0 (0)

SLE: systemic lupus erythematosus; SNP: single nucleotide polymorphism; VDR: vitamin D receptor; anti-dsDNA: anti-double-stranded DNA; OR: odds ratio; CI: confidence interval.

^aOR = 3.01, CI = 1.04–9.70, *p*-value = 0.036; ^bOR = 2.82, CI = 1.04–7.94, *p*-value = 0.040; ^cOR = 0.37, CI = 0.14–0.97, *p*-value = 0.036; ^dOR = 0.33, CI = 0.10 – 1.01, *p*-value = 0.046; ^eOR = 0.37, CI = 0.13–1.02, *p*-value = 0.041; ^fOR = 0.36, CI = 0.17–0.74, *p*-value = 0.003; ^gOR = 17.05, CI = 2.15–785.1, *p*-value = 0.001.

Table 4 SLE patients' clinical manifestation (%) stratified accordingly to patients' ethnicity and gender

Clinical Manifestations	Ethnic group		Sex	
	European n=120 (%)	African n=38 (%)	Female n=147 (%)	Male n=11 (%)
Photosensitivity	39 (32.5)	6 (15.8)	44 (30)	1 (9.1)
Serositis	33 (27.5)	7 (18.4)	37 (25.2)	3 (27.3)
Arthritis	54 (45)	14 (36.8)	63 (42.9)	5 (45.5)
Cutaneous alterations	74 (61.7)	14 (36.8) ¹	82 (55.8)	6 (54.5)
Neuropsychiatric disorder	26 (21.7)	4 (10.5)	28 (19)	2 (18.2)
Nephritic disorder	64 (53.4)	23 (60.5)	80 (54.4)	7 (63.6)
Hematological alterations	71 (59.2)	13 (34.2) ²	78 (53)	6 (54.5)
Immunological alterations	68 (56.7)	19 (50)	83 (56.5)	4 (36.4)
Antinuclear Factor positive (FAN)	101 (84.2)	28 (73.7)	121 (82.3)	8 (72.7)
Antibody anti DNA (anti ds-DNA)	28 (23.4)	6 (15.8)	34 (23.1)	0 (0)
Antiphospholipid syndrome (APS)	23 (19.2)	9 (23.7)	31 (21.1)	1 (9.1)
Raynaud phenomenon	7 (5.8)	1 (2.6)	7 (4.8)	1 (9.1)

SLE: systemic lupus erythematosus; anti-dsDNA: anti-double-stranded DNA; OR: odds ratio; CI: confidence interval.

¹OR = 0.36, CI = 0.16–0.82, *p* = 0.009; ²OR = 0.36, CI = 0.15–0.81, *p* = 0.009.

CAPÍTULO III

**CAPÍTULO III – COMPREHENSIVE ANALYSIS OF
POLYMORPHISMS IN THE HLA-5' UPSTREAM REGULATORY AND
3' UNTRANSLATED REGIONS INBRAZILIAN PATIENTS WITH
SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS**

Comprehensive analysis of polymorphisms in the HLA-G 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions in Brazilian patients with Systemic Lupus Erythematosus

Enviado a revista: “*Rheumatology*”

Fator de impacto (2012): 4.212

Comprehensive analysis of polymorphisms in the HLA-G 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions in Brazilian patients with Systemic Lupus Erythematosus

Eulalia Catamo^a, Catarina Addobbati^{b,c}, Ludovica Segat^d, Thiago Sotero Fragoso^{c,e}, Andrea Tavares Dantas^e, Henrique de Ataíde Mariz^e, Laurindo Ferreira da Rocha Junior^e, Angela Luiza Branco Pinto Duarte^e, Antonio Victor Campos Coelho^{b,c}, Ronald Rodrigues de Moura^{b,c}, Vania Polesello^d, Sergio Crovella^{a,d}, Paula Sandrin-Garcia^{b,c}.

Abstract

Objective This study aims to comprehensively analyze HLA-G polymorphisms association with susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus (SLE) development and clinical manifestations. **Methods:** The HLA-G 5' upstream regulatory region (URR), 3' untranslated region (UTR) and a cytosine deletion at exon 3 (Δ C, HLA-G*0105N allele) were analyzed in 114 SLE patients and 128 healthy controls from North East Brazil.

Results: The 3003T>C T allele and the TCGITCCCGAG haplotype were significantly more frequent in healthy controls than SLE patients and were associated with a protective effect for disease development (O.R. = 0.21, p = 0.007). Other polymorphisms were associated with different clinical manifestations. **Conclusion:** Although HLA-G role in SLE disease is far from being elucidated yet, our findings suggest that HLA-G might be able to slightly modulate the complex SLE phenotype.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus, Human Leukocyte Antigen (HLA)-G; Polymorphisms; mRNA stability; Clinical manifestation

Grants:

This work has been supported by the Brazilian National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) with grants n. 552195/2011-1, n. 471942/2010-3, and by the Italian Ministry of Health grant RC06/11. VP is recipient of a fellowship from IRCCS Burlo Garfalo RC 06/11.

E. Catamo MSc, PhD student University of Trieste (Italy); C. Addobbati MSc, PhD student Federal University of Pernambuco (Recife, Brasil); L. Segat PhD, Senior Researcher, IRCCS Burlo Garofolo (Trieste, Italy) T.S. Fragoso MD, PhD student Federal University of Pernambuco (Recife, Brasil); A. T. Dantas MD Rheumatology resident “Hospital das Clinicas” Recife (Brasil) , H. A. Mariz MD, Rheumatology resident “Hospital das Clinicas” Recife (Brasil); L.F. da Rocha Jr. MD, Rheumatology resident “Hospital das Clinicas” Recife (Brasil); A.L.B.P. Duarte MD, PhD Professor of Rheumatology, Federal University of Pernambuco (Recife, Brasil); A.V.C. Coelho MSc, PhD student Federal University of Pernambuco (Recife, Brasil); R. R. de Moura MSc , PhD student Federal University of Pernambuco (Recife, Brasil); V. Polesello MSc, fellow at IRCCS Burlo Garofolo (Trieste, Italy); S. Crovella PhD, Senior Researcher, IRCCS Burlo Garofolo (Trieste, Italy) and Professor Human Genetics University of Trieste (Italy); P. Sandrin-Garcia PhD Associate professor Genetics, Federal University of Pernambuco (Recife, Brasil).

Name and address of author to whom requests for reprints should be made

Sergio Crovella

IRCCS Burlo Garofolo, Via dell'Istria 65/1, 34137 Trieste (Italy)

Tel. +39.040.3785273 Fax. +39.040.3785540

e-mail: sergio.crovella@burlo.trieste.it

Address for correspondence

IRCCS Burlo Garofolo, Via dell'Istria 65/1, 34137 Trieste (Italy)

Tel. +39.040.3785422 Fax. +39.040.3785540

Short Title: Systemic Lupus Erythematosus and HLA-G

INTRODUCTION

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory and autoimmune disease that affects almost 10 times more frequently women in reproductive age than men¹.

SLE is mediated by the deposit of immune complexes in several organs and presents hyperactivity of type B lymphocytes, production of numerous auto-antibodies directed against nuclear antigens, and defective function of T cell²⁻⁴.

The development of SLE is multifactorial and depends on the interaction of genetic, hormonal, immunological and environmental factors⁵.

Genome-wide linkage studies identified three regions in strong linkage with SLE: 6p21.1-q15, 20p11-q13.13 and 16p13-q12.2¹. The *HLA-G* gene, located at 6p21.3, lupus “hotbed” region of chromosome 6, encodes a nonclassical class Ib major histocompatibility complex molecule, characterized by restricted tissue expression, low DNA polymorphism and expression of both membrane (HLA-G1 to HLA-G4) and soluble (HLA-G5 to HLA-G7) isoforms by alternative splicing (reviewed in Carosella et al⁶). Both isoforms are able to bind to inhibitory receptors, such as Ig-like transcript 2 (ILT2) and 4 (ILT4), and killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR2DL4), inhibiting the effector function of T lymphocytes and natural killer (NK) cells, suggesting the *HLA-G* as a component in the immunosuppression process (reviewed in Carosella et al.⁷.

Genetic variants have been shown to alter *HLA-G* expression and play a role on the development of rheumatologic diseases⁸⁻¹⁰. Consiglio et al.⁵ found significant difference in the distribution of allelic, genotypic and haplotypic frequencies of the 14bp del/ins and 3142C>G polymorphisms among SLE patients, with an increased frequency of the G allele and 14bp-del/3142G haplotype in SLE subjects. Moreover, the authors reported that the double heterozygous patients (characterized by the contemporary presence of 14bp del/ins and 3142C>G polymorphisms) show lower disease activity scores, with respect to heterozygotes

for only one of the variants or with respect to wild-type subjects, confirming the involvement of the HLA-G molecule on SLE susceptibility and outcome.

Rizzo et al.¹¹ observed a significantly different distribution of the 14bp I/I genotype in SLE patients with respect to controls, and this genotype was associated with a lower production of the anti-inflammatory HLA-G molecule in plasma of SLE patients.

Recently, Lucena-Silva et al.¹² have reported the association of 3142 G and 3010 C alleles with susceptibility to develop SLE in patients from North East Brazil (Recife), while a UTR-1 haplotype conferred protection.

Considering all the previous associations reported, and trying to replicate the findings of Lucena Silva et al.¹², we enrolled SLE patients from their same geographic area (Recife, North East Brazil) and sequenced the HLA-G 5' upstream regulatory region (URR) as well as 3' untranslated regions (UTR), also analyzing a cytosine deletion at exon 3 (ΔC , HLA-G*0105N allele). Our study was aimed at performing a comprehensive analysis of HLA-G polymorphisms and risk of SLE development, as well as SLE clinical manifestations.

Finally, to better ascertain the potential involvement of *HLA-G* in the SLE susceptibility, we also performed a meta-analysis for the most studied HLA-G polymorphism, namely the 14bp del/ins.

MATERIAL AND METHODS

Subjects and controls

For this study, we enrolled 114 SLE Brazilian patients (mean age 37.5 ± 10.4 years, 110 females and 4 males), and 128 Brazilian controls (mean age 34.11 ± 13.04 years, 105 females and 23 males).

The patients were followed-up at the Division of Rheumatology, Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco, Brazil, and fulfilled the American College of Rheumatology Criteria for SLE diagnosis. Clinical and laboratorial data regarding SLE patients were collected and are depicted in Table 1. Clinical data were missing (or not complete) for 7 SLE patients.

The healthy controls were blood donors coming from the same geographic area of SLE patients who did not present any previous family history of autoimmune disorders as ascertained by the physicians using an appropriate questionnaire.

The ethics committee of Federal University of Pernambuco, Brazil, approved the study (CAAE 03065312.3.0000.5208) and written informed consent was obtained from all individuals.

DNA extraction and genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using DNA Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) according to manufacturer's protocol.

HLA-G 5'UTR and 3'UTR polymorphisms have been detected using direct sequencing of PCR products amplified with the following primers: 5'UTR forward 5'-CACGGAACTTAGGGCTACGG-3' and 5'UTR reverse 5'-GCGTCTGGGGAGAATGAGTCC-3' (annealing temperature 65°C); 3'UTR forward 5'-GCTGTGCTATGAGGTTTCTTG-3 and 3'UTR reverse 5'-

CGTGTACTGTGGAAAGTTCTCA-3' (annealing temperature 59°C). The BigDye Terminator Sequencing kit has been used for sequencing reaction, run on the ABI PRISM 3130XL automated DNA sequencer (Applied Biosystems, USA). Sequences were handled using the 4Peaks (<http://mekentosj.com/4peaks/>) and Codon-Code Aligner (<http://www.codoncode.com/aligner/>) software. HLA-G Δ C deletion at exon 3, G*0105N allele, was detected by PCR-RFLP as previously reported¹³. Briefly, the digestion of PCR products was made overnight at 37°C with the PpuMI endonuclease (New England Biolabs, Beverly, MA) and afterwards fragments were separated on a 3% agarose gel. The Δ C allele was characterized by one fragment of 276bp, while C allele by two fragments of 108 and 168bp. Direct sequencing of 100 *HLA-G* randomly chosen amplicons for each polymorphism was used as genotyping quality control.

Statistical analysis

Allele and genotype frequencies were calculated by direct gene counting. Statistical significance of difference in allele and genotype frequencies was calculated by Fisher's exact test. The odds ratio (O.R.) and 95% confidence interval (C.I.) were also computed. The open-source R package (www.r-project.org) was used for all statistical analyses. Haplotypes and the eventual presence of linkage disequilibrium (LD) between *HLA-G* polymorphisms were evaluated by using the free available online software Arlequin 3.11 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>). Statistical significance of difference in haplotype frequencies was calculated by logistic regression.

Meta-analysis: search strategy, eligibility criteria for study selection and statistical analysis

Genetic association studies published regarding HLA-G alleles and susceptibility to SLE were retrieved through search in MeSH database (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/>).

Keywords included the terms "Lupus Erythematosus, Systemic/genetics", "HLA-G Antigens", "Autoimmune Diseases", "HLA-G Antigens" and "Polymorphism, Single Nucleotide".

For inclusion in the meta-analysis, the studies had to be case-control studies published in peer-reviewed journals, reporting SNPs genotypic proportions for both cases and controls. Adherence to Hardy-Weinberg (HW) equilibrium for the case and control groups was assessed by χ^2 tests. Cochran's Q test was used to evaluate the heterogeneity between studies: a $p < 0.10$, implicates that heterogeneity is likely to be present. The pooled O.R. and its associated 95% C.I. were calculated accordingly to Cochran's Q test outcome: if heterogeneity is detected, a random-effects is applied (DerSimonian-Laird procedure), otherwise a fixed-effect models (Mantel-Haenszel test) is used. Z test was used to calculate the associated p-value for the pooled OR. Presence of publication bias, commonly defined as underrepresentation of no association results in the literature¹⁴, was assessed using Egger's test. Except for Cochran's Q test, the significance level was set at $\alpha = 0.05$. All tests were two-sided. All statistical procedures were performed through "metafor" package¹⁵ available for R software version 3.0.1.

RESULTS

HLA-G genotyping

A total of 25 genetic variants were detected and analyzed: 16 in the 5'UTR, 8 in the 3'UTR and the ΔC deletion (G*0105N) in the third exon of *HLA-G* (Table 2).

No significant differences were found when comparing the allele and genotype frequencies of all *HLA-G* studied SNPs between SLE patients and controls (data not shown), except for the 3003 T>C (rs1707) polymorphism (Table 3). The 3003 T>C T allele was indeed significantly more frequent in healthy controls than SLE patients (94% vs. 88%, $p = 0.026$, O.R. 0.48, 95% C.I. 0.23-0.94), and was associated with a protective effect for disease development according to a recessive genetic model (T/T vs. C/T+C/C; $p = 0.017$, O.R. = 0.43, 95% C.I. = 0.20-0.90). The C/C genotype was extremely rare, and was found only in one patient and in one control. Genotype frequencies for the 3003T>C SNP were in HW equilibrium in both patients and controls groups ($\chi^2 = 0.39$, $p = 0.53$ and $\chi^2 = 0.57$ $p = 0.45$ respectively).

The possible association between HLA-G polymorphisms and several clinical parameters of SLE patients (described in table 1) was also evaluated, and significant associations were found (Table 4).

In the triallelic -725 C>G>T SNP, the presence of the -725 G allele inversely associated with the presence of cutaneous alteration (malar and discoid rashes, and oral ulcers) according to a dominant model ($p = 0.0009$, O.R. 0.15, 95% C.I. 0.04-0.53).

The insG540 nucleotide variation, found only in SLE patients with arthritis, was associated with increased risk of developing this clinical manifestation in a dominant model (-/G + G/G vs. -/-, $p = 0.02$, O.R. inf., 95% C.I. 1.18-inf)

The presence of a mutant allele in homozygosis at position -762 C>T (and consequently at -716 T>G, -689 A>G, -666 G>T, -633 G>A, -486 A>C and -201 G>A, due to

the presence of strong linkage disequilibrium, $D' > 0.99$) significantly associated in a recessive genetic model (T/T vs. C/T+T/T) with the presence of hematological alterations ($p = 0.038$, O.R. 3.18, 95% C.I. 1.04-11.79).

The -400 G>A and -391 G>A A alleles were associated with increased risk of developing immunological alterations ($p = 0.031$, O.R. 3.58, 95% C.I. 1-13.88) and anti ds-DNA antibodies ($p = 0.005$, O.R. 5.44, 95% C.I. 1.45-21.68) according to a dominant genetic model.

Haplotypes were reconstructed using 13 variants from the total 25. This was done to reduce data dimensionality and redundancy, thus facilitating logistic regression. First, the SNPs -762 C>T, -716 T>G, -689 A>G, -666 G>T, -633 G>A, -486 A>C and -201 G>A were removed due to the presence of strong linkage disequilibrium with -725 C>T. Similarly, -391 G>A was removed due to linkage disequilibrium with -400 G>A. Second, SNPs not associated to any clinical status or trait during univariate analysis were removed (delA533, -509 C>G, -477 C>G, and -369 C>A). The reconstructed haplotypes are displayed in Table 5. The TCGITCCCGAG haplotype was significantly more frequent in healthy controls than in SLE patients (4% vs. 2%, $p = 0.007$) and was associated with lower risk for the development of the disease (O.R. 0.21, 95% C.I. 0.07-0.65).

Meta-analysis

The literature search produced five genetic association studies evaluating *HLA-G* polymorphisms association with SLE susceptibility. Rizzo et al.¹¹ recruited cases and controls from Italy, Wu et al.¹⁶ Han Chinese subjects, Veit et al.¹⁷ and Consiglio et al.⁵ recruited individuals from South Brazil (Rio Grande do Sul state) and Lucena-Silva et al.¹² recruited two more Brazilian groups: one from Recife (Pernambuco state, Northeast Brazil) and the other from São Paulo (São Paulo state, Southeast Brazil).

The 14bp del/ins SNP was the only *HLA-G* polymorphism that was assessed in all studies, including ours, and thus was the only one that we analyzed with the meta-analysis that included a total of 1221 SLE patients and 1802 healthy individuals. No deviations from HW equilibrium were observed in controls, nor globally considered, nor in considering the single studies sub-groups. Table 6 summarizes the epidemiological and clinical data reported by the authors.

The Cochran's Q test showed no indication for the presence of heterogeneity between studies ($Q = 8.22$, $p = 0.22$, degrees of freedom = 6). Thus, a fixed-effect model was assumed and the Mantel-Haenszel test was used for calculation of the pooled O.R. pertaining to *HLA-G* 14bp del/ins allelic frequencies. The Mantel-Hanzel method test (fixed-effects model) showed a statistically significant association of the 14bp insertion allele with SLE, although it had a small effect size (pooled O.R. = 1.14, 95% C.I. = 1.02-1.27, $p = 0.02$). Egger's test showed no evidence for publication bias (test statistic = 0.31, $p = 0.76$).

DISCUSSION

HLA-G gene expression can vary according the presence of genetic polymorphisms (18). A possible association between HLA-G levels and susceptibility to develop SLE (or modulate its clinical features), has been shown in different populations with distinct ethnic background^{5,11}.

In our study we analyzed the ΔC deletion in exon 3 (characterizing the HLA-G*0105N allele) as well as *HLA-G* gene polymorphisms localized in the 800bp upstream the ATG (5'UTR) and in the whole 3'UTR, in North Eastern Brazilian SLE patients and controls. No statistically significant association with risk of SLE development were found for all the 16 5'UTR SNPs, for the ΔC deletion, as well as for 7 out of 8 3'UTR SNPs.

A significant association was instead found for the 3'UTR 3003T>C SNP, the T allele and T/T genotype being associated with protection against development of SLE. The biological effect of this genetic variant is not known, although the presence of the 3003 T allele might cause increased transcriptional stability and decreased microRNAs (miRNAs) binding affinity compared to the C allele, as described *in silico*^{19,20}.

After considering the possible role of the HLA-G variants on SLE susceptibility, we also investigated the possible association of HLA-G polymorphisms with the clinical parameters of SLE, stratifying SLE patients according to the presence or absence of different clinical manifestations. For some of the SNPs, we found an association with different clinical manifestation of SLE.

The -725 G allele, known to create a CpG dinucleotide together with the -726 C allele that could suffer methylation and consequently diminish HLA-G expression^{21,22}, was associated in our study with protection against the development of cutaneous alterations (O.R. 0.18). Since two different studies^{23,24} have observed an increased HLA-G expression in skin

lesions of psoriasis and atopic dermatitis, we can hypothesize that lower HLA-G expression may be protective against the development of cutaneous alterations.

No functional role has been reported yet for the insG540 SNP, associated in our study with lupus arthritis, and for the haplotype block in the 5'URR (-762 C>T, -716 T>G, -689 A>G, -666 G>T, -633 G>A, -486 A>C and -201 G>A) associated with hematological alteration, nor for the -400 G>A and -391 G>A SNPs associated with immunological alteration and with anti ds-DNA production. All these polymorphisms however are located at the 5'URR, within or close to the critical sites for *HLA-G* gene transcription and, therefore, we could assume that these nucleotide variations could alter the HLA-G transcription and molecule production.

Different studies^{5,11,12,16,17} have been published so far concerning the role of common HLA-G variants and SLE susceptibility, sometimes presenting contradictory findings. In order to better disclose the possible involvement of these variants, we decided to perform a meta-analysis; the only SNP present in all the published studies retrieved from the literature search, and thus included in our meta-analysis, was the 14bp del/ins SNP.

The 14 bp insertion has been correlated with low sHLA-G levels in SLE patients and increased disease susceptibility by Rizzo et al.¹¹, while others authors^{12,16,17} lacked to find this association. Also in our work, no significant association between this SNP and SLE susceptibility has been found.

The results of meta-analysis have pointed toward a small effect of this polymorphism on disease susceptibility, being the 14pb insertion slightly associated to increased risk of SLE development (pooled O.R. value of 1.14). Heterogeneity and publication's bias tests were not significant, so we are quite confident that confounding factor due to geographical differences among the samples have not affected the results.

Since the meta-analysis achieves a collective larger sample size, it is capable to detect even those small effect-sizes (such as the one observed for *HLA-G* 14 bp del/ins variant) not identifiable with single limited association studies. Lucena-Silva et al.¹²; Wu et al.¹⁵; Veit et al.¹⁷ studies, as well as our, may have lacked to find the association of the 14 bp del/ins variant and SLE due to a limited power of the studies. It is also not excluded that other HLA-G variants, such as the 3003 T>C identified in this study but not in other, could indeed be associated with SLE.

In addition to small effect size, it is also possible that some association are not detectable when analyzing individual SNPs, given that HLA-G expression levels are possibly modulated not only by single SNPs, but also by the combination of SNPs at the haplotype level. For this reason we had implemented our association study including the study of HLA-G haplotypes: unexpectedly, we found a protective effect (O.R. 0.22) towards SLE development for the TCGITCCCGAG haplotype. This haplotype (also known as UTR-2 haplotype) has been associated with lower sHLA-G level compared to haplotypes with the 14bp deletion, 3142 C and 3187 C alleles²⁵. The UTR-2 haplotype presents in fact, among other variants, the 14bp insertion, the 3142 G and 3187 A alleles, as well as the Δ C deletion at exon 3, all variations known to be associated with lower levels of HLA-G: the 14bp insertion, 3142 G and 3187 A alleles associate with increased HLA-G mRNA instability²⁶ while the Δ C distinguishes the null HLA-G*0105N allele which presents premature stop codons that impede the formation of HLA-G1 and -G5 isoforms and the translation of HLA-G4²⁷. Rizzo et al.¹¹ and Wu et al.¹⁵ found significantly increased levels of HLA-G in SLE patients with respect to controls, so we can hypothesize that lower levels of HLA-G could be protective against the development of the disease.

However we must bear in mind that all associations found between HLA-G polymorphisms and SLE clinical manifestations are quite modest, and the role of those polymorphisms in the modulation of SLE phenotype, consequently moderate.

Moreover, our study, aimed at replicating Lucena-Silva et al.¹² findings, showed that, in spite of having selected patients and controls from the same town (Recife, North East Brazil) led to different results, being the 3003 T>C polymorphism associated with susceptibility to develop SLE in our study, while the 3010 C>G and 3142C>G polymorphisms conferred susceptibility to SLE in the Lucena-Silva study. Only HLA-G haplotypes (although not completely concordant) conferred a slight protection against development of SLE in both studies.

The fact that, in a replica study performed in the same town, HLA-G polymorphisms did not provide similar results in terms of association with SLE, gives us an idea of the very small effect of this gene on predisposition to the complex phenotype represented by SLE.

Our findings, including meta-analysis, lead us to conclude that, even if HLA-G is located in a supposed “hotbed” region for SLE, its effect on the predisposition to develop the pathology is not so relevant and it should not be considered as a good candidate gene for SLE, but eventually just a sort of modifier gene with very little impact on the phenotype.

Furthermore up to now, for most of the studied SNPs the functional role on *HLA-G* regulation is not know, as well as the role of the HLA-G molecule. Moreover, the effective role of HLA-G molecule in the development of the SLE disease and its clinical manifestations is far from being elucidated up to now; all results are indicating that a multifactorial panel of immunological components could act together in concert to trigger the development of the disease. Functional validation of HLA-G variants is mandatory to confirm if HLA-G molecule has a role, even if little, in SLE susceptibility or disease development (as evidenced

by our meta-analysis of recent results reported by independent investigators), or if is only a genetic marker of association, maybe in linkage disequilibrium with other susceptibility loci.

REFERENCES

1. Forabosco P, Gorman JD, Cleveland C, Kelly JA, Fisher SA, Ortmann WA, et al. Meta-analysis of genome-wide linkage studies of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2006;7:609-14.
2. Lipsky PE. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol* 2001;2:764-66.
3. Renaudineau Y, Pers JO, Bendaoud B, Jamin C, Youinou P. Dysfunctional B cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2004;3:516-23.
4. Takeuchi T, Tsuzaka K, Abe T. Altered expression of the T cell receptor-CD3 complex in systemic lupus erythematosus. *Int Rev Immunol* 2004;23:273-91.
5. Consiglio CR, Veit TD, Monticelo OA, Mucenic T, Xavier RM, Brenol JC, et al. Association of the HLA-G gene +3142C>G polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2011;77:540-45.
6. Carosella ED, Moreau P, Le Maoult J, Le Discorde M, Dausset J, Rouas-Freiss N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol* 2003;81:199-252.
7. Carosella ED, HoWangYin KY, Favier B, LeMaoult J. HLA-G-dependent suppressor cells: diverse by nature, function, and significance. *Hum Immunol* 2008;69:700-7.
8. Hviid TV, Milman N, Hylenius S, Jakobsen K, Jensen MS, Larsen LG. HLA-G polymorphisms and HLA-G expression in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2006;23:30-7.
9. Park KS, Park JS, Nam JH, Bang D, Sohn S, Lee ES. HLA-E*0101 and HLA-G*010101 reduce the risk of Behcet's disease. *Tissue Antigens* 2007;69:139-44.
10. Veit TD, Vianna P, Scheibel I, Brenol CV, Brenol JC, Xavier RM, et al. Association of the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism with juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 2008;71:440-6.
11. Rizzo R, Hviid TV, Govoni M, Padovan M, Rubini M, Melchiorri L, et al. HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2008;71:520-9.
12. Lucena-Silva N, de Souza VS, Gomes RG, Fantinatti A, Muniz YC, de Albuquerque RS, et al. HLA-G 3' untranslated region polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in 2 Brazilian populations. *J Rheumatol* 2013;40:1104-13.
13. Gómez-Casado E, Martínez-Lasot J, Castro MJ, Morales P, Trapaga J, Berciano M, et al. Detection of HLA-E and -G DNA alleles for population and disease studies. *Cell Mol Life Sci* 1999;56:356-62.

14. Rothstein HR, Sutton AJ, Borenstein M. Publication bias in meta-analysis: prevention, assessment and adjustments. Wiley 2006.
15. Viechtbauer W. Conducting meta-analyses in R with the metafor package. J Stat Softw 2010;36:1-48.
16. Wu FX, Wu LJ, Luo XY, Tang Z, Yang MH, Xie CM, et al. Lack of association between HLA-G 14-bp polymorphism and systemic lupus erythematosus in a Han Chinese population. Lupus 2009;18:1259-66.
17. Veit TD, Cordero EA, Mucenic T, Monticielo OA, Brenol JC, Xavier RM, et al. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. Lupus 2009;18:424-30.
18. Castelli EC, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Roger M, Moreau P, Donadi EA. A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution. Mol Biol Evol 2011;28:3069-86.
19. Suryanarayana V, Rao L, Kanakavalli M, Padmalatha V, Raseswari T, Deenadayal M, et al. Association between novel HLA-G genotypes and risk of current miscarriages: a case-control study in a South Indian population. Reprod Sci 2008;15:817-24.
20. Castelli EC, Moreau P, Oya e Chiromatzo A, Mendes-Junior CT, Veiga-Castelli LC, Yaghi L, et al. In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. Hum Immunol 2009;70:1020-5.
21. Moreau P, Mouillot G, Rousseau P, Marcou C, Dauseet J, Carosella ED. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:1191-6.
22. Ober C, Aldrich CL, Chervoneva I, Billstrand C, Rahimov F, Gray HL, et al. Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates. Am J Hum Genet 2003;72:1425-35.
23. Aractingi S, Briand N, Le Danff, Viguiet M, Bachelez H, Michel L, et al. HLA-G and NK receptor are expressed in psoriatic skin: a possible pathway for regulating infiltrating T cells? Am J Pathol 2001;159:71-7.
24. Khosrotehrani K, Le Danff C, Reynaud-Mendel B, Dubertret L, Carosella ED, Aractingi S. HLA-G expression in atopic dermatitis. J Invest Dermatol 2001;117:750-2.
25. Di Cristofaro J, El Moujally D, Agnel A, Mazières S, Cortey M, Basire A, et al. HLA-G haplotype structure shows good conservation between different populations and good correlation with high, normal and low soluble HLA-G expression. Hum Immunol 2013;74:203-6.
26. Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NH, de Albuquerque RS, Muniz YC, Simões RT, et al. The structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. Genes Immun 2010;11:134-41.

27. Le Discorse M, Le Danff C, Moreau P, Rouas-Freiss N, Carosella ED. HLA-G*0105N null allele encodes functional HLA-G isoforms. *Biol Reprod* 2005;73:280-8.

Table 1: Clinical and laboratorial characteristics of SLE patients

Clinical/laboratorial characteristics	Number of patients (%)
Cutaneous alterations (malar and discoid rashes, oral ulcers)	93/107 (86.9%)
Nephritis	54/107 (50.5%)
Arthritis	77/107 (72%)
Hematological alterations (lymphopenia, leucopenia, thrombocytopenia)	73/107 (68.2%)
Immunological alterations (Anti-SM, Anti-Ro/SSA, Anticardiolipin)	33/107 (30.8%)
Anti double-strand DNA antibody (anti ds-DNA)	26/107 (24.35%)
Photosensitivity	72/107 (67.3%)
Serositis (Pleuritis, Pericarditis)	24/107 (22.4%)
Neuropsychiatric disorders	8/107 (7.5%)
AntiNuclear Factor positive (FAN)	100/107 (93.5%)
Antiphospholipid Syndrome (APS)	6/107 (5.6%)

Table 2: *HLA-G* gene polymorphisms analyzed

SNP	rs	Chromosome Position (bp)	Gene region
-762T>C	rs1632946	29794860	5'URR
-725C>G>T	rs1233334	29794897	5'URR
-716G>T	rs2249863	29794906	5'URR
-689G>A	rs2735022	29794933	5'URR
-666T>G	rs35674592	29794956	5'URR
-646A>G	rs17875391	29794976	5'URR
-633A>G	rs1632944	29794989	5'URR
-540G>INS	rs17875392	29795077:29795078	5'URR
-533A>DEL	rs370236002	29795089	5'URR
-509C>G	rs17875393	29795113	5'URR
-486C>A	rs1736933	29795136	5'URR
-477G>C	rs1736932	29795145	5'URR
-400G>A	rs17875395	29795222	5'URR
-391G>A	rs17875396	29795231	5'URR
-369A>C	rs1632943	29795253	5'URR
-201A>G	rs1233333	29795421	5'URR
0105NΔC	rs41557518	29796435	Exon 3
14bpDEL/INS	rs1704	29798581:29798582	3'UTR
3003T>C	rs1707	29798610	3'UTR
3010C>G	rs1710	29798617	3'UTR
3027C>A	rs17179101	29798634	3'UTR
3035C>T	rs17179108	29798642	3'UTR
3142G>C	rs1063320	29798749	3'UTR
3187A>G	rs9380142	29798794	3'UTR
3196C>G	rs1610696	29798803	3'UTR

Table 3: *HLA-G* 3003 T>C (rs1707) SNP association with SLE susceptibility

3003T>C <i>HLA-G</i> SNP	SLE Patients	Controls	p value, Odds Ratio, and 95% Confidence Interval
C	28/228 (0.12)	16/256 (0.06)	O.R. 1
T	200/228 (0.88)	240/256 (0.94)	$p = 0.026$, O.R. 0.48, 95% C.I. 0.23-0.94
T/C + C/C	27/114 (0.24)	15/128 (0.12)	O.R. 1
T/T	87/114 (0.76)	113/128 (0.88)	$p = 0.017$, O.R. 0.43, 95% C.I. 0.20-0.90

Table 4: HLA-G SNPs significantly associated with SLE clinical features

SNP	SLE Clinical feature		p-value, Odds Ratio, and 95% Confidence Interval	
-725 C>G>T	Cutaneous alteration			
	yes (n=79)	no (n=28)		
	C/C + C/T + T/T	73 (92.5%)	18 (64%)	O.R. 1
	C/G	6 (7.5%)	10 (36%)	p = 0.0009, O.R. 0.15, 95% C.I. 0.04-0.53
insG540	Arthritis			
	yes (n=77)	no (n=30)		
	-/G + G/G	12 (16%)	0 (0%)	O.R. 1
	-/-	65 (84%)	30 (100%)	p = 0.02, O.R. inf, 95% C.I. 1.18-inf
-762 C>T [#]	Hematological alteration			
	yes (n=73)	no (n=34)		
	C/T + C/C	47 (64.5%)	29 (85%)	O.R. 1
	T/T	26 (35.5%)	5 (15%)	p = 0.038, O.R. 3.18, 95% C.I. 1.04-11.79
- 400 G>A; -391 G>A	Immunological alteration			
	yes (n=33)	no (n=74)		
	G/G	25 (76%)	68 (92%)	O.R. 1
	G/A + A/A	8 (24%)	6 (8%)	p = 0.031, O.R. 3.58, 95% C.I. 1-13.88
- 400 G>A; -391 G>A	ds-DNA antibodies			
	yes (n=26)	no (n=81)		
	G/G	18 (69%)	75 (93%)	O.R. 1
	G/A + A/A	8 (31%)	6 (7%)	p = 0.005, O.R. 5.44, 95% C.I. 1.45-21.68

[#]due to the presence of strong linkage disequilibrium, the same association observed for -762 C>T SNP is observed also for -716 T>G; -689 A>G; -666 G>T; -633 G>A; -486 A>C; -201 G>A

Table 5 : HLA-G haplotypes count (and frequencies) in SLE patients and controls.

HAPLOTYPES [#]													PATIENT	CONTROL	LOGISTIC REGRESSION COEFFICIENT	OR (95% CI)	p
-762 C>T	-725 C>G>T	insG540	-400 G>A	0105NΔC	14bp D>I	3003 T>C	3010 G>C	3027 C>A	3035 C>T	3142 C>G	3187 A>G	3196 C>G					
C	C	-	G	C	D	T	G	C	C	C	A	C	12 (5%)	14 (5%)	reference	-	-
T	C	-	G	C	I	T	C	C	C	G	A	G	55 (24%)	61 (24%)	0.5320	1.70 (0.75-12.50)	0.21
C	C	-	G	C	D	T	G	C	C	C	G	C	45 (20%)	61 (24%)	0.2623	1.29 (0.57-8.32)	0.53
T	C	-	G	C	D	T	C	C	C	G	A	C	35 (16%)	44 (17%)	0.4646	1.59 (0.69-11.35)	0.28
C	G	-	G	C	D	C	G	C	C	C	A	C	16 (7%)	11 (4%)	0.6436	1.90 (0.76-16.89)	0.17
T	C	-	G	C	I	T	C	A	T	G	A	C	9 (4%)	13 (5%)	0.2029	1.23 (0.40-10.32)	0.72
C	T	G	A	C	I	T	C	C	T	G	A	C	3 (1%)	5 (2%)	0.4895	1.64 (0.58-14.30)	0.35
T	C	-	G	-	I	T	C	C	C	G	A	G	4 (2%)	10 (4%)	-1.5740	0.21 (0.07-0.65)	0.007
C	C	-	G	C	D	C	G	C	C	C	A	C	8 (4%)	5 (2%)	0.9590	2.61 (0.74-47.87)	0.14
C	T	G	A	C	I	T	C	C	T	G	A	C	3 (1%)	5 (2%)	-0.2134	0.81 (0.21-8.55)	0.76
C	C	-	G	C	D	T	C	C	C	G	G	C	4 (2%)	0	1.4055	4.08 (0.60-400.38)	0.15
C	C	-	G	C	D	T	G	C	C	C	A	G	4 (2%)	0	0.0538	1.06 (0.39-7.77)	0.92
C	C	-	G	C	I	T	C	C	C	G	A	G	3 (1%)	0	0.5321	1.70 (0.75-12.50)	0.21

[#] only the haplotypes with a frequency greater or equal to 1% were included.

Table 6: Summary of the HLA-G 3'UTR 14bp del/ins polymorphism and SLE studies included in the meta-analysis.

Study	Country	Sample Size		Men/Women Ratio in Cases Group ^a	Mean Age of Cases	Mean value of SLEDAI index [n ^d]	Mean value of SLICC index [n ^d]
		Cases	Controls				
Rizzo et al., 2008	Italy	200	451	1/4	53.2 ± 10.7	2 ^b (0-20) ^c [NR]	1 ^b (0-6) ^c [NR]
Veit et al., 2009	Brazil (RS)	293	460	1/10	44.5 ± 14.2	2.66 ± 3.73 [159]	1.11 ± 1.46 [190]
Wu et al., 2009	China	231	367	1/14	36.4 ± 32.2	9.78 ± 5.74 [231]	NR
Lucena-Silva et al., 2013	Brazil (SP)	140	147	1/23	39 ^b (17-66) ^c	NR	NR
Catamo et al., 2013	Brazil (PE)	114	128	1/28	37.5 ± 10.4	NR	NR

a - The ratio is approximate.

b - Median value.

c- Interquartile range.

d - Number of patients analyzed.

SLEDAI - Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

SLICC - Systemic Lupus International Collaborating Clinics cumulative damage index.

NR – not reported.

RS – Rio Grande do Sul, Southern Brazil state.

SP – São Paulo, Southeast Brazil state.

PE – Pernambuco, Northeast Brazil state

CONSIDERAÇÕES

FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Associação de polimorfismos do gene codificante do *VDR* e o LES

- Houve associação entre o genótipo G/G do SNP rs11168268 (A>G) e dos genótipos G/G e A/G do rs2248098 (A>G) com a susceptibilidade ao LES, na população de Recife/PE;
- Não houve associação entre os SNPs testados e a susceptibilidade ao LES, em pacientes de Ribeirão Preto/SP;
- Na população de Recife/PE, houve associação da doença renal secundária ao LES com polimorfismos dos SNPs rs11168268 (A>G), rs1540339 (C>T) e rs2248098 (A>G);
- Na população de Ribeirão Preto/SP, as seguintes manifestações clínicas e alterações imunológicas tiveram associação com o LES: alterações cutâneas (rs11168268), alterações imunológicas (rs2248098), artrite (*rs3890733*) e produção de anticorpos anti-DNA (*rs4760648*).

2. Polimorfismos do gene codificante do *HLA-G* e o LES

- O alelo T do SNP 3003T>C e o haplótipo TCGITCCCGAG do *HLA-G* foram significativamente mais frequentes em controles saudáveis do que em pacientes, conferindo proteção ao LES, em indivíduos de Recife/PE;
- O SNP trialélico -725 C>G>T foi inversamente associado com a presença de alterações cutâneas do LES;
- O -400 G>A e -391 G>A foram relacionados a um aumento do risco de desenvolver alterações imunológicas do LES;
- A presença de um alelo mutante em homozigose na posição -762 C>T foi associado com manifestações hematológicas da doença;
- A insG540 foi associada ao aumento do risco de artrite nos pacientes com LES da cidade de Recife-PE;
- A meta-análise envolvendo o polimorfismo responsável pela del/ins 14bp do *HLA-G*, demonstrou associação da inserção de 14 pb com a susceptibilidade ao LES.

Sendo assim, os resultados destes estudos demonstraram que polimorfismos dos genes codificantes do VDR e HLA-G podem estar associados à susceptibilidade ao LES, além da modulação do fenótipo patológico da doença. No entanto, devido à influência de fatores ambientais e epigenéticos, o impacto das alterações genéticas encontradas nas pesquisas realizadas ainda precisam ser replicadas em diferentes populações.

ANEXO

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PROJETO DE PESQUISA

Título: "POLIMORFISMOS DOS GENES CODIFICANTES DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA: ASSOCIAÇÃO COM A SUSCEPTIBILIDADE AO LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E ARTRITE REUMATÓIDE"

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03065312.3.0000.5208

Pesquisador: PAULA SANDRIN GARCIA

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 105.992

Data da Relatoria: 11/09/2012

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atendeu as as pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão para início da coleta de dados. Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.