



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

POLIMORFISMOS DO GENE *FYB* (PROTEÍNA LIGANTE DE FYN):
ASSOCIAÇÃO COM O LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

CATARINA ADDOBBATI JORDÃO CAVALCANTI

Recife
2013

**POLIMORFISMOS DO GENE *FYB* (PROTEÍNA LIGANTE DE FYN):
ASSOCIAÇÃO COM O LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

CATARINA ADDOBBATI JORDÃO CAVALCANTI

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 Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

ORIENTADOR: DR. SERGIO CROVELLA

COORIENTADORA: DRA. PAULA SANDRIN-GARCIA

Recife

2013

Catálogo na Fonte:

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

C376p Cavalcanti, Catarina Addobbati Jordão

Polimorfismos do gene FYB (proteína ligante de FYN): associação com o Lúpus eritematoso sistêmico / Catarina Addobbati Jordão Cavalcanti. – Recife: O Autor, 2013.

138. : il.

Orientador: Sergio Crovella

Coorientadora: Paula Sandrin-Garcia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

1. Lúpus Eritematoso Sistêmico 2. Doenças autoimunes 3. Polimorfismo (genética) I. Crovella, Sergio (orientador) II. Sandrin-Garcia, Paula (coorientadora) III. Título.

616.772

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2013-084

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

REITOR

Prof(a). Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof(a). Dr. Sílvia Romero Marques

PRÓ-REITOR(A) PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

**COORDENAÇÃO ADMINISTRATIVA DO LABORATÓRIO DE
IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI**

Profa. Dra. Maria do Carmo Pimentel

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

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: ADDOBBATI, Catarina Jordão Cavalcanti

Título: Polimorfismos do Gene *FYB* (Proteína Ligante de Fyn): associação com o Lúpus Eritematoso Sistêmico

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

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Departamento de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

Departamento de Biologia - Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Sergio Crovella

Departamento de Genética - Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me deu saúde e permitiu essa conquista.

Aos meus pais e familiares pelo amor incondicional, educação e apoio dado.

Ao meu orientador Sergio Crovella por me dar essa oportunidade.

A minha coorientadora Paula por acreditar em mim e ser muito mais que uma coorientadora.

Aos colegas de laboratório pela ajuda e pelos momentos de descontração.

A Eliete, Ilma e funcionários do LIKA que sempre me ajudaram quando precisei.

Ao LIKA, Prof. José Luiz e Prof. Luiz Carvalho pela infraestrutura cedida.

Obrigada a todos que de uma maneira ou de outra permitiram essa conquista!

RESUMO

Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune que afeta diversos órgãos e sistemas. Embora os fatores que contribuem para a patogenia da doença não estejam completamente esclarecidos, sabe-se que o LES é um distúrbio multifatorial com influência de fatores genéticos e ambientais e com o envolvimento de células B e T autorreativas contra uma variedade de componentes celulares. Sabendo-se que o gene *FYB* (Proteína Ligante de Fyn) codifica uma proteína adaptadora que participa da cascata de ativação dos linfócitos T e que uma desordem nesse processo pode influenciar o desenvolvimento da autoimunidade, esse gene foi considerado candidato à susceptibilidade ao LES. Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo, foi observada a associação dos TagSNPs rs6863066 e rs358501, localizados nas regiões 5'UTR e 3'UTR do gene respectivamente, com a susceptibilidade ao LES em uma população de Ribeirão Preto/SP. Uma vez que TagSNPs representam outros SNPs que se encontram em desequilíbrio de ligação, o presente estudo analisou possíveis associações entre o desenvolvimento do LES e SNPs representados pelos TagSNPs rs6863066 e rs358501 na mesma população. Para confirmarmos a associação do desenvolvimento do LES com os TagSNPs rs6863066 e rs358501 e outros TagSNPs, também foi realizado um estudo de replica na população de Pernambuco. Para isso, sequenciamos a região promotora e parte das regiões 5'UTR e 3'UTR do gene *FYB* no grupo de Ribeirão Preto/SP e genotipamos 7 TagSNPs no grupo amostral de Pernambuco. O grupo de estudo foi composto por 143 pacientes e 184 controles de Ribeirão Preto/SP; e 116 pacientes e 162 controles de Pernambuco. Na população de Ribeirão Preto/SP, além da confirmação da associação com os SNPs rs6863066 e rs358501, também foi observada a associação do SNP rs13188259 G>A no promotor do gene *FYB* com o desenvolvimento do LES: tanto a presença do alelo A (OR = 1,77, CI = 1,27 – 2,47, $p = 0,001$), como dos genótipos A/A (OR = 2,6, CI = 1,19 – 5,64, $p = 0,003$) e G/A (OR = 2,2, CI = 1,37 – 3,52, $p = 0,001$) mostraram conferir risco ao desenvolvimento do LES. Na população de Pernambuco, nenhuma associação com a susceptibilidade foi observada, entretanto foi encontrada a associação entre o alelo T (OR = 3,5, CI = 1,13 – 10,83, $p = 0,02$) e o genótipo T/T (OR = 11,8, CI = 1,1 – 123,3, $p = 0,01$) do SNP rs6863066 C>T e do alelo G (OR = 3,9, CI = 1,26 – 12,03, $p = 0,01$) e genótipo G/G (OR = 8,15, CI = 1,3 – 49,5, $p = 0,002$) do SNP rs2161612 A>G com a ocorrência da Síndrome Antifosfolípídeo. Também foram observadas a associação entre o alelo G (OR =

2,4, CI = 1,28 – 4,6, $p = 0,005$) e o genótipo G/G (OR = 5,22, CI = 1,6 – 17,6, $p = 0,004$) do SNP rs2161612 A>G e o desenvolvimento da serosite e a associação entre o alelo A (OR = 4,4, CI = 1,22 – 15,96, $p = 0,01$) e o genótipo G/A (OR = 4,89, CI = 1,3 – 18,6, $p = 0,01$) do SNP rs1642515 G>A, o alelo T (OR = 2,14, CI = 1,1 – 4,2, $p = 0,03$) e o genótipo T/T (OR = 5,3, CI = 1,42 – 19,8, $p = 0,006$) do SNP rs404122 A>T e o alelo C (OR = 2,4, CI = 1,2 – 4,9, $p = 0,01$) e o genótipo C/C (OR = 8,6, CI = 1,8 – 40,9, $p = 0,002$) do SNP rs358501 T>C com a ocorrência de úlceras nos pacientes com LES. Esses resultados sugerem um possível envolvimento do gene *FYB* no desenvolvimento do LES e suas manifestações clínicas e laboratoriais, contribuindo para uma maior compreensão da patogênese do LES.

Palavras-chave: Lúpus Eritematoso Sistêmico, *FYB*, SNP.

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease that may affect multiples organs and systems. Although the factors involved on the pathogenesis of this disease are still not completely understood, it is well known that SLE is a multifactorial disorder influenced by genetic and environmental factors with the existence of autoreactive T and B cells against several cellular components. Since *FYB* gene (Fyn Binding Protein) encodes an adaptor protein that acts in some steps of T cells activation signaling cascade and a disorder in these events could influence the development of an autoimmune process, this gene was considered a candidate to SLE susceptibility. In a previous study of our group, an association of the TagSNPs rs6863066 and rs358501, located at 5'UTR and 3'UTR of *FYB* gene, respectively, with SLE susceptibility was found in a Brazilian population from Ribeirão Preto/ SP. Since TagSNPs represent other SNPs that are in linkage disequilibrium, the present study evaluates the possible association between SLE development and SNPs covered by the TagSNPs rs6863066 and rs358501 in the same population. In order to confirm the association of rs6863066 and rs358501 SNPs and other TagSNPs with SLE susceptibility, we also replicated the previous study in a population from Pernambuco. Thus, we sequenced the promoter region, part of 5'UTR and 3'UTR of *FYB* gene in the group from Ribeirão Preto/SP and genotyped 7 TagSNPs in the group from Pernambuco. The study group comprised 143 patients and 184 healthy controls from Ribeirão Preto/SP; and 116 patients and 162 healthy controls from Pernambuco. In the population from Ribeirão Preto/SP, besides confirming the association with rs6863066 and rs358501 SNPs, we also observed an association of rs13188259 G>A SNP, in the promoter of *FYB* gene, with the development of SLE: the presence of A allele (OR = 1.77, CI = 1.27 – 2.47, $p = 0.001$) and both A/A (OR = 2.6, CI = 1.19 - 5.64, $p = 0.003$) and G/A genotypes (OR = 2.2, CI = 1.37 - 3.52, $p = 0.001$) showed to confer risk for SLE development. In the population from Pernambuco, no association between the studied TagSNPs and SLE susceptibility was found. However, an association of T allele (OR = 3.5, CI = 1.13 – 10.83, $p = 0.02$) and T/T genotype (OR = 11.8, CI = 1.1 – 123.3, $p = 0.01$) of rs6863066 C>T SNP and G allele (OR = 3.9, CI = 1.26 – 12.03, $p = 0.01$) and G/G genotype (OR = 8.15, CI = 1.3 – 49.5, $p = 0.002$) of rs2161612 A>G SNP with the occurrence of Antiphospholipid Syndrome was observed. We also found an association between the G allele (OR = 2.4, CI = 1.28 – 4.6, $p = 0.005$) and G/G genotype (OR = 5.22, CI = 1.6 – 17.6, $p = 0.004$) of rs2161612 A>G SNP and serositis development and an association of A allele

(OR = 4.4, CI = 1.22 – 15.96, p = 0.01) and G/A genotype (OR = 4.89, CI = 1.3 – 18.6, p = 0.01) of rs1642515 G>A SNP, T allele (OR = 2.14, CI = 1.1 – 4.2, p = 0.03) and T/T genotype (OR = 5.3, CI = 1.42 – 19.8, p = 0.006) of rs404122 A>T SNP and C allele (OR = 2.4, CI = 1.2 – 4.9, p = 0.01) and C/C genotype (OR = 8.6, CI = 1.8 – 40.9, p = 0.002) of rs358501 T>C SNP with the ulcers occurrence in SLE patients. Our findings indicate a possible involvement of *FYB* gene on SLE and its clinical and laboratorial manifestations development, contributing to a better knowledge of SLE pathogenesis.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus, *FYB*, SNP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fatores genéticos, ambientais, imunológicos, hormonais e epigenéticos atuando juntos para a perda da autotolerância no LES e consequente dano a diferentes órgãos.	20
Figura 2. Manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com LES, envolvendo os diferentes órgãos e sistemas.	26
Figura 3. Rash malar ou lesão em asa de borboleta – uma das principais lesões dermatológicas dos pacientes com LES.	27
Figura 4. Erupções cutâneas causadas pela exposição à luz ultravioleta.	28
Figura 5. Placas características do rash discoide.	28
Figura 6: Alterações causadas pelo Fênomeno de Raynaud.	29
Figura 7: Artrite desencadeada pelo LES.	30
Figura 8: Genes associados ao desenvolvimento do LES com suas respectivas localizações cromossômicas e funções.	41
Figura 9: Interação das tirosinas cinases e das proteínas adaptadoras após estímulo do TCR.	43
Figura 10: Formação do conjugado entre a célula T e a APC: com o estímulo do TCR, as integrinas sofrem alterações conformacionais que permitem o seu agrupamento ao receptor e sua ligação às ICAMs-1 da APC.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Incidência e prevalência do LES em diferentes etnias e países.	18
Tabela 2. Critérios para diagnóstico do LES de acordo com a Sociedade Americana de Reumatologia	34

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR	Sociedade Americana de Reumatologia
ADAP	Proteína adaptadora promotora de adesão e degranulação
ANA	Anticorpo antinuclear
Anti-dsDNA	Anticorpo anti-DNA dupla fita
Anti-Ro	Antirribonucleoproteína Ro
Anti-Smith	Antiproteína Smith
APC	Célula apresentadora de antígeno
BANK	Proteína de célula B com repetições de anquirina
BLK	Tirosina cinase de linfócito B
CCL2	Quimiocina ligante 2
CCL5	Quimiocina ligante 5
CD	Grupo de diferenciação
CRP	Proteína C reativa
CSNK1G3	Caseína cinase 1 gama 3
CTLA-4	Antígeno de linfócito T citotóxico 4
CXCL10	Quimiocina motivo C-X-C ligante 10
CXCL9	Quimiocina motivo C-X-C ligante 9
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Proteína ativada por mitógeno 1
ETS1	V-ets vírus da eritroblastose homólogo 1 do oncogene E2
FAM167A	Membro A da família com similaridade de sequência 167
FCGR2A	Receptor Fc gama IIA
FCGR2B	Receptor Fc gama IIB
FCGR3A	Receptor Fc gama IIIA
FCGR3B	Receptor Fc gama IIIB
FYB	Proteína ligante de Fyn

GADS	Grb2 relacionados ao adaptador de Shc
GWAS	Estudo de associação genômica em larga escala
HLA	Antígeno leucocitário humano
ICAM-1	Moléculas intracelulares de adesão 1
IFN	Interferon
IRAK1	Cinase associada ao receptor de interleucina 1
IRF5	Fator regulador de Interferon 5
ITAM	Imunorreceptor com motivos de ativação baseado em tirosina
ITGAM1	Integrina alfa M 1
ITK	Cinase de células T indutora de interleucina 2
JNK	Proteína cinase ativada por mitógeno 8
LAT	Linker para ativação de células T
Lck	Proteína tirosina cinase específica de células linfocitárias
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LFA-1	Antígeno associado à função leucocitária 1
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MBL	Lectina ligadora de manose
NK	Natural killer
PANK1	Cinase pantotenato 1
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PGBD3	Derivado 3 do elemento transponível PiggyBac
PLC γ 1	Fosfolipase C isoforma γ 1
PRDM1	Domínio contendo 1 PR, com domínio ZNF
PTPN22	Proteína tirosina fosfatase, não-receptor tipo 22
RNA	Ácido ribonucleico
SEMA4A	Semaforina 4A
SKAP-55	Proteína associada a cinase src de 55 kDa
SLAP-130	Proteína associada à SLP-76 de 130Kd

SLC38A1	Membro 1 da família carreadora de soluto 38
SLP-76	Proteína leucocitária de 76 kDa contendo o domínio homólogo a Src 2
SNP	Polimorfismo de base única
STAT4	Sinal de transdução e ativação de transcrição 4
STK17A	Cinase serina/treonina 17 A
TCR	Receptor de célula T
TNFAIP3	Proteína 3 induzida por fator de necrose tumoral alfa
TNFSF4	Superfamília de fator de necrose tumoral 4
Treg	Linfócito T regulador
TREX1	Exonuclease de reparação 1
U1RNP	Ribonucleoproteína U1
UTR	Região não traduzida
VPS4B	Proteína vacuolar homologa a 4B
WASp	Proteína da Síndrome Wiskott-Aldrich
ZAP-70	Proteína cinase associada a cadeia ζ de 70kDa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	17
2.1.1 EPIDEMIOLOGIA	17
2.1.2 PATOGÊNESE DO LES	19
2.1.2.1 ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS NO LES	20
2.1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS DO LES	25
2.1.4 O LES E OS FATORES AMBIENTAIS	35
2.1.5 A GENÉTICA DO LES	36
2.1.5.1 GENE <i>FYB</i>	42
2.1.5.1.1 PROTEÍNA FYB	42
3. OBJETIVOS	47
3.1 OBJETIVO GERAL	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ARTIGO 1	59
ARTIGO 2	84
CONCLUSÕES FINAIS	103
ANEXO A	104
ANEXO B	138

1. INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune que pode afetar diversos órgãos e sistemas do corpo humano. As suas manifestações clínicas e laboratoriais são múltiplas, podendo haver alterações cutâneas, hematológicas e imunológicas e desordens renais e neurológicas em qualquer fase da doença.

Embora os fatores que contribuem para a patogenia da doença não estejam completamente esclarecidos, sabe-se que mecanismos genéticos, ambientais e imunológicos estão envolvidos no desenvolvimento da doença. Dentre as anormalidades imunológicas, os pacientes com LES podem apresentar diversas alterações relacionadas principalmente com os linfócitos T e B. A interação de fatores ambientais e hormonais em indivíduos geneticamente susceptíveis, predispõe o indivíduo à hiperatividade de linfócitos B e T, induzindo à formação de autoanticorpos dirigidos contra os constituintes celulares. Os autoanticorpos são depositados em forma de imunocomplexos em tecidos e órgãos, causando a ativação do sistema complemento e aumentando a atividade inflamatória, gerando um quadro de autoimunidade dirigido contra os tecidos e órgãos do indivíduo.

A genética do LES é complexa, sendo, na maioria das vezes, necessária a atuação conjunta de vários genes para o desencadeamento da doença. Diversos estudos têm identificado vários genes que predispõem o indivíduo à patogenia e estão envolvidos no desenvolvimento da doença. A identificação de polimorfismos nesses genes é atualmente uma das mais importantes linhas de investigação no sentido de entender como a autoimunidade progride e quais suas causas.

O gene *FYB* (Proteína ligante de Fyb) codifica uma proteína adaptadora que participa da regulação da ativação dos linfócitos T após o reconhecimento do antígeno apresentado pela células apresentadoras de antígeno (APC). Uma vez que as células T são um ponto crucial no desenvolvimento de processos autoimunes, uma desregulação na sua ativação pode ser considerada como possível fator no desenvolvimento do LES. Dessa forma, este trabalho analisou a possível associação de Polimorfismos de Base Única (SNPs) no gene *FYB* com o desenvolvimento do LES e suas principais manifestações clínicas em pacientes e controles saudáveis da população de Ribeirão Preto/SP e Pernambuco.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

2.1.1 EPIDEMIOLOGIA

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) apresenta incidência e prevalência bastante variada nas diferentes regiões do mundo (KYTTARIS, 2010) (Tabela 1). As taxas de incidência variam aproximadamente de 1 a 10 a cada 100.000 pessoas por ano, enquanto a prevalência em geral varia de 20 a 70 a cada 100.000 pessoas (PONS-ESTEL et al., 2010). Essa diferença significativa nas taxas de prevalência e incidência nas diversas regiões do mundo deve-se principalmente a variações nos fatores genéticos populacionais e ambientais (VILAR; SATO, 2002; KYTTARIS et al., 2010). Isso pode ser observado entre as diferentes etnias, como por exemplo, nos descendentes de africanos e asiáticos, os quais são 2 a 3 vezes mais afetados pelo LES do que as populações caucasianas (CHAKRAVARTY et al., 2007; KYTTARIS et al., 2010).

As taxas de incidência podem mostrar acentuadas diferenças entre as regiões de um mesmo país. Um exemplo é o Brasil, onde se observa tanto uma grande miscigenação racial e cultural como diferentes condições climáticas, o que pode influenciar de forma diferente no aparecimento e evolução da doença e, consequentemente, nas taxas de incidência da doença. Os únicos estudos epidemiológicos do LES na população brasileira foram realizados na cidade de Natal no Nordeste do país, o qual mostrou uma incidência anual de 8,7 a cada 100.000 pessoas, com uma maior frequência em mulheres (14,1: 2,2) (VILAR; SATO, 2002). Contraditoriamente, na cidade de Cascavel no Paraná, sul do Brasil, foi observada uma incidência de 4,8 casos por 100.000 habitantes/ano (NAKASHIMA et al., 2011). A diferença de incidência encontrada entre as cidades de Cascavel e Natal pode ser explicada pelas altas taxas de raios ultravioleta encontradas na região geográfica de Natal (VILAR; SATO, 2002; NAKASHIMA et al., 2011), assim como pela composição étnica das cidades, uma vez que Natal tem o percentual de pardos e negros superior à cidade de Cascavel (NAKASHIMA et al., 2011).

Tabela 1. Incidência e prevalência do LES em diferentes etnias e países (Adaptada de DANCHENKO et al., 2006).

	Incidência (100.000 pessoas/ano)	Prevalência (100.000 pessoas)
USA		
Todas as etnias	5,1	52,2
Branços	1,4	7,4
Negros	4,5	19,5
Porto-riquenhos	2,2	18
CANADÁ		
Branços	1,6	20,6
Primeiros nativos	4,7	42,3
FINLÂNDIA		
	NA	28
FRANÇA		
	5,0	40
ITÁLIA		
	NA	71
IRLANDA DO NORTE		
	NA	25,4
ESPANHA		
Todas as etnias	NA	91
Branços	2,2	34,1
SUIÇA		
	4,7	42
REINO UNIDO		
Todas as etnias	3,8	26,2
Branços	3,0	20,5
Asiáticos	10,0	47,8
Afrocaribenhos	21,9	159,4
AUSTRÁLIA		
Branços	NA	19,3
Aborígenes	11	63,1
JAPÃO		
	2,9	28,4
NA= não avaliado		

O LES está associado ao sexo, afetando predominantemente mulheres na fase reprodutiva, com uma taxa que varia de 6 a 14 mulheres afetadas para cada homem afetado, sendo menos comum em crianças e idosos (KYTTARIS et al., 2010). Em crianças, as taxas de prevalência e incidência também apresentam uma grande variação dependendo da região estudada. Por exemplo, na Europa e na América do Norte, a incidência anual do LES em crianças menores de 16 anos é menor que 1 a cada 100.000 pessoas (HUEMER et al., 2001), enquanto que em Taiwan, a prevalência do LES infantil é estimada em 6,3 a cada 100.000 pessoas (HUANG; YAO; SEE, 2004). Diferentemente da fase adulta, a diferença entre a incidência nos sexos feminino e masculino na infância e na senescência não é tão alta, o que

confirma a influência dos fatores hormonais no desenvolvimento da doença (KYTTARIS et al., 2010).

2.1.2 PATOGÊNESE DO LES

As doenças autoimunes ocorrem em mais de 5% da população (TOBÓN et al., 2012) e são caracterizadas por um descontrole do sistema imune devido à perda da capacidade de diferenciação do "próprio" do "não próprio", ou seja, da capacidade de autotolerância do sistema imunológico. Sendo assim, as moléculas que são produzidas normalmente pelo organismo ou aquelas que não eram imunogênicas passam a ser consideradas partículas estranhas, iniciando um processo anormal de combate a essas moléculas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

A autotolerância pode ser dividida em tolerância central e tolerância periférica. Na tolerância central, linfócitos imaturos que reconhecem antígenos próprios na medula óssea e no timo são eliminados por apoptose. No caso da tolerância periférica, linfócitos reativos maduros quando encontram antígenos próprios nos tecidos periféricos são eliminados ou desativados pelos mecanismos de anergia, apoptose ou supressão pelos linfócitos T reguladores. Quando os linfócitos autorreativos escapam desses mecanismos de tolerância e são influenciados por outros fatores, ocorre o desenvolvimento da resposta autoimune com a formação dos autoanticorpos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

O LES é uma doença autoimune, a qual compromete diversos órgãos e sistemas, apresentando diferentes manifestações clínicas e laboratoriais. Apesar da sua etiologia desconhecida, sabe-se que o LES, além de ser uma doença autoimune, também é uma desordem multifatorial, com o seu desenvolvimento associado a fatores imunológicos, hormonais, ambientais e genéticos (SATO et al., 2006).

A perda da autotolerância no LES está associada tanto com anormalidades nas células B como nas células T (CHAVELE; EHRENSTEIN, 2011). Os mecanismos da patogênese do LES alcança todo o sistema imune (APOSTOLIDIS et al., 2011), ocorrendo a interação entre inúmeras citocinas, quimiocinas, moléculas de sinalização e receptores de reconhecimento padrão nas diferentes vias do sistema imune e a liberação de autoanticorpos e formação de imunocomplexos (YU et al., 2012) (Figura 1).

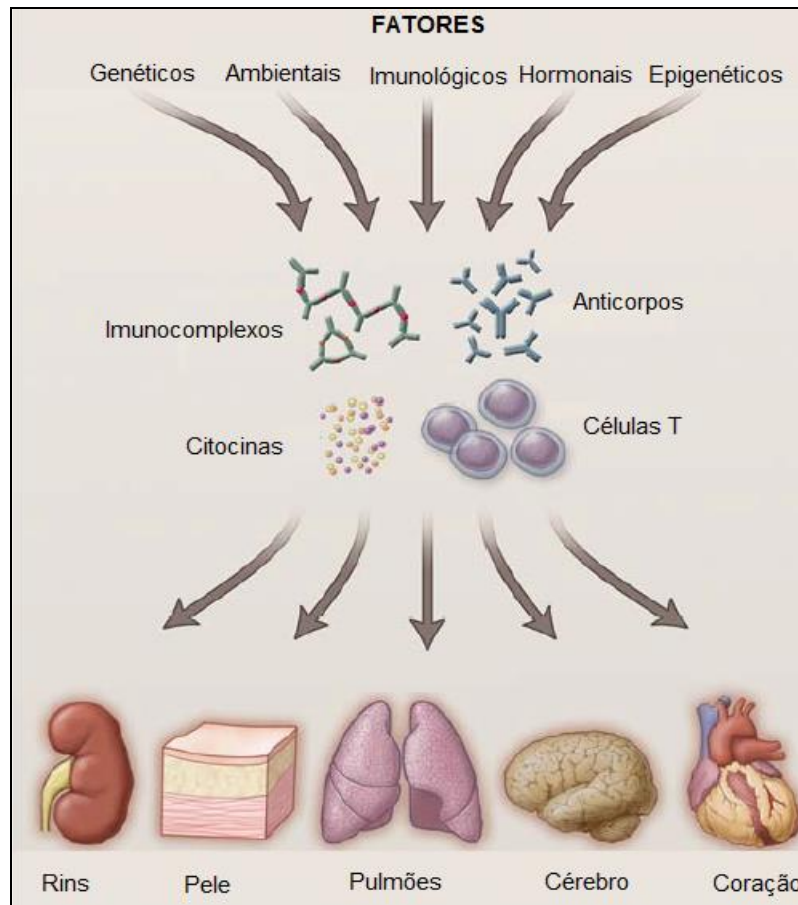


Figura 1. Fatores genéticos, ambientais, imunológicos, hormonais e epigenéticos atuando juntos para a perda da autotolerância no LES e consequente dano a diferentes órgãos (Fonte: adaptada de Tsokos, GC, 2011).

2.1.2.1 ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS NO LES

As citocinas, proteínas secretadas pelas células da imunidade inata e adaptativa, parecem ter um papel essencial na modulação da resposta contra antígenos estranhos e próprios e, consequentemente, na patogênese do LES. Seus efeitos podem tanto ser estimulantes, como na proliferação, ativação e quimiotaxia, como também supressores, favorecendo a diminuição ou a interrupção de uma resposta imune (APOSTOLIDIS et al., 2011).

Inúmeros estudos tentam esclarecer o envolvimento das citocinas nas vias de desenvolvimento da autoimunidade. A IL-2 é produzida pelas células T e tem uma importante função na expansão, contração e homeostase de várias células do sistema imune. Uma das características do LES é ter uma deficiência na produção de IL-2 pelas células T, o que

contribui para a redução do número de Tregs (Linfócito T Regulador), uma vez que a expansão dessas células é dependente de IL-2 (LIEBERMAN; TSOKOS, 2010). Em estudos com camundongos com IL-2 ou receptor para IL-2 ausentes, foi visto que há o desenvolvimento de doenças autoimunes severas caracterizadas por linfoproliferação, esplenomegalia e anemia, assim como elevados títulos de autoanticorpos similares aos dos pacientes com LES (APOSTOLIDIS et al., 2011).

A IL -12, a qual parece ser o estimulante central da produção de citocinas pró-inflamatórias, foi encontrada em níveis séricos elevados em pacientes com LES e mostrou-se associada com a progressão da glomerulonefrite, umas das principais complicações clínicas da doença, mostrando-se dessa maneira como um dos possíveis responsáveis pelo desenvolvimento da resposta inflamatória em pacientes com LES severo, provavelmente através do recrutamento de leucócitos para o local da inflamação (KITCHING et al., 2005). FAVILLI et al. (2009) demonstraram níveis elevados de IL-18 no plasma de pessoas com LES com correlação positiva com a severidade da doença e que essa citocina está aparentemente envolvida tanto com os eventos patogênicos iniciais como também na fase tardia da doença.

A IL-33, citocina associada com a patogênese de doenças inflamatórias crônicas, tem como parte do seu receptor a proteína ST2. Níveis séricos elevados da ST2 solúvel (sST2) foram detectados em pacientes com LES e correlacionados com a atividade e severidade da doença (MOK et al., 2010). Em outro estudo, os níveis de IL-33 além de estarem significativamente mais altos quando comparados com pessoas saudáveis, também foram associados com trombocitopenia, eritrocitopenia e presença de anticorpo anti-SSB, sugerindo que a IL-33 deve apresentar algum efeito sobre os eritrócitos e plaquetas em pacientes com LES (YANG et al., 2011).

O Interferon tipo I (IFN α e IFN β) apresenta diversas funções, como antiviral, antiproliferativa e na modulação da resposta imune. Devido a esses efeitos, o IFN I foi considerado como um dos possíveis responsáveis pelo processo patogênico de diversas doenças autoimunes, incluindo o LES (APOSTOLIDIS et al., 2011). Uma alta produção de IFN α foi observada em famílias com pessoas afetadas pelo LES, tanto nos familiares saudáveis como nos pacientes (NIEWOLD et al., 2007; NIEWOLD et al., 2008), indicando que o controle genético do IFN I é importante para a susceptibilidade à doença, mas que, para o desenvolvimento das manifestações clínicas, são necessários ainda a associação com outros

fatores como por exemplo polimorfismos genéticos em outros genes, fatores ambientais e hormonais (APOSTOLIDIS et al, 2011). Outro estudo analisou a expressão gênica de IFN I em pacientes com LES e mostrou que mais de 90% apresentam altos níveis séricos dessa citocina, porém apenas 40 a 50% dos pacientes tinham uma atividade significativa de IFN, sugerindo também que fatores adicionais são necessários para uma sensibilidade aos sinais liberados pelo IFN (APOSTOLIDIS et al., 2011). Altas expressões de IFN têm sido detectadas em tecidos afetados pelo LES, como por exemplo, os rins (BENNETT et al., 2003; PASCUAL; BANCHEREAU; PALUCKA, 2003; RONNBLOM; ALM; ELORANTA, 2009).

As quimiocinas tem o papel principal de direcionar a migração celular e atrair as células efectoras para os locais de inflamação. Uma vez que a infiltração de linfócitos e outros leucócitos nos sítios de inflamação apresenta um papel crucial na patogênese do LES, há evidências de que as quimiocinas e seus receptores estão envolvidos com a regulação da inflamação e tráfico de leucócitos nos órgãos afetados pelo LES (YU et al., 2012). As quimiocinas CCL2 (Quimiocina ligante 2), CCL5 (Quimiocina ligante 5), CXCL9 (Quimiocina motivo C-X-C ligante 9), CXCL10 (Quimiocina motivo C-X-C ligante 10) e CXCL13 (Quimiocina motivo C-X-C ligante 13) mostraram-se em níveis elevados em pacientes com LES (LIT et al., 2006, WONG et al., 2010, YU et al., 2012). Além disso, a CCL2 e a CXCL10 mostraram concentrações elevadas no fluido do sistema nervoso central de pacientes com a síndrome neuropsiquiátrica do LES quando comparadas com pacientes com LES sem a síndrome, sendo então potenciais marcadores dessa manifestação clínica (OKAMOTO et al., 2004; OKAMOTO et al., 2006).

As moléculas de vias de sinalização também influenciam no desenvolvimento da autoimunidade, uma vez que podem participar da modulação da transcrição gênica, proliferação celular, apoptose e expressão de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e metaloproteinases (CRISPIN et al, 2010). GORJESTANI et al. (2008), por exemplo, encontraram níveis elevados de ERK (Proteína cinase ativada por mitógeno 1) em linfócitos T de pacientes com LES, enquanto WONG et al. (2009) mostraram a hipótese de que a p38 MAPK (Proteína cinase ativada por mitógeno) e a JNK (Proteína cinase ativada por mitógeno 8) são moléculas-chave na regulação intracelular da inflamação mediada pela hiperatividade dos linfócitos B e T no LES.

Os autoanticorpos são produzidos pelas células B autorreativas, as quais fazem parte do repertório normal de células de indivíduos normais. Entretanto, no LES, essas células

desempenham uma funcionalidade aberrante, provavelmente resultante do seu processo de maturação defeituoso (KYTTARIS, 2010). Foi observado que populações de células B “naive” em pacientes com LES apresentavam mais de 50% das células autorreativas antes mesmo do primeiro encontro com antígenos. Esses achados sugerem falhas dos pontos de verificação durante a maturação desses linfócitos, as quais resultam em um maior número de células B autorreativas produzindo autoanticorpos (YURASOV et al., 2005).

Em condições normais, as células B imaturas que reconhecem e são ativadas contra autoantígenos durante seu processo de maturação são submetidas à seleção negativa pelos mecanismos de tolerância do sistema imune, prevenindo a presença de linfócitos B autorreativos em órgãos imunes periféricos (YURASOV et al., 2006; KYTTARIS, 2010). Entretanto, células B que reconhecem antígenos próprios podem não passar por essa seleção devido a uma ativação comprometida causada por desordens no seu sistema de sinalização intracelular. HOM et al. (2008) mostraram que uma dessas desordens é a diminuição na produção de RNAm de BLK (Tirosina cinase de linfócito B), o qual codifica a família Src de tirosinas cinases, responsáveis pela sinalização intracelular da ativação do receptor de linfócito B.

Uma vez que já escaparam dos mecanismos de autotolerância, os linfócitos B autorreativos, assim como as células T autorreativas, ao terem seus receptores ativados, apresentam o influxo de cálcio e a fosforilação de tirosinas aumentados (KYTTARIS, 2010). Além disso, a regulação dessas células mostrou-se comprometida, uma vez que uma das vias de regulação negativa, a via do receptor $Fc\gamma RIIb$ (um regulador da ativação do receptor de células B) está deprimida (ENYEDY et al., 2001; MACKAY et al., 2006). Devido a essas e outras desordens no balanceamento entre os sinais de ativação e inibição nas células B no LES, a produção de autoanticorpos é exacerbada (CRISPIN et al., 2010).

As células B podem influenciar a função dos linfócitos T, como por exemplo, produzindo anticorpos que se ligam às moléculas CD3 das células T, desencadeando sinais intracelulares que podem bloquear a transcrição do gene da IL-2 (JUANG et al., 2005), levando a uma deficiência dessa citocina, o que pode contribuir para redução de Tregs (LIEBERMAN; TSOKOS, 2010) e para a supressão da ativação da morte celular de células T autorreativas (CRISPIN et al., 2010).

Do mesmo modo, as células T também podem interferir nas células B, auxiliando-as a produzir autoanticorpos. Dessa maneira, as células B e T autorreativas contribuem em

conjunto para a produção de autoanticorpos, para o desequilíbrio das citocinas e para a infiltração tecidual de células nos tecidos, levando ao estabelecimento das manifestações clínicas do LES (KYTTARIS, 2010).

Uma vez que os linfócitos T reguladores (Tregs) estão envolvidos com o controle da tolerância periférica, pequenas desordens nessas células podem contribuir para o desenvolvimento do LES (CHAVELE; EHRENSTEIN, 2011). Alguns estudos revelaram uma deficiência dessas células circulantes em pacientes com LES e uma diferença nos níveis de Tregs entre pacientes com a doença ativa e inativa. Outros estudos, analisando a funcionalidade desse tipo de linfócito em pacientes com LES, mostraram anormalidades no poder de supressão dos Tregs, assim como uma resistência à supressão por parte dos outros linfócitos (MIYARA et al, 2005; VALENCIA et al, 2007; BONELLI et al, 2008; LEE et al, 2008). CHAVELE et al. (2011) também observaram uma relação inversa entre o poder de supressão dos Tregs e a atividade da doença. Entretanto, a investigação do papel dos Tregs em humanos é limitada, uma vez que o número de marcadores específicos para essas células é pequeno e muitas vezes compartilhado de forma transiente com outros linfócitos T. Além disso, a atividade da doença e as diferentes terapias administradas influenciam no número e função dessas células (CHAVELE et al, 2011).

Em condições normais, a produção de autoanticorpos é importante para a remoção de autoantígenos liberados tanto por células em apoptose como em necrose. A remoção inadequada dessas células apoptóticas tem sido descrita e relacionada à ativação anormal de macrófagos, os quais apresentam os autoantígenos às células B e T, levando a uma produção exacerbada de autoanticorpos e, conseqüentemente, a um processo autoimune (D'CRUZ; KHAMASHTA; HUGHES, 2007). A produção de autoanticorpos causa a formação de imunocomplexos, os quais se depositam nos tecidos e ativam o sistema complemento, e, caso não sejam removidos, há o desencadeamento da resposta inflamatória, causando o dano tecidual (KYTTARIS, 2010). Essa teoria foi fortalecida pelo fato de vários componentes do complemento se apresentarem em desequilíbrio e terem seus genes associados com a susceptibilidade ao LES. Indivíduos com deficiência de C1q, C2 ou C4 mostraram um risco maior de desenvolver o LES do que pessoas saudáveis. Pessoas com deficiência de C1q mostraram um risco de 90% de desenvolvimento do LES, enquanto pessoas com níveis de C2 diminuídos e total ausência de C4, mostraram um risco de 10 e 75%, respectivamente (MANDERSON; BOTTO; WALPORT, 2004; GHEBREHIWET; PEERSCHKE, 2004).

Esses achados indicam o papel fundamental do complemento, não apenas como primeira linha de defesa contra patógenos, mas também no processo de desenvolvimento da autoimunidade, uma vez que os componentes do complemento opsonizam os imunocomplexos, facilitando a sua remoção e, conseqüentemente, prevenindo o desencadeamento de uma resposta inflamatória (KYTTARIS, 2010).

Além dos componentes da via clássica do complemento, o LES também foi associado com os componentes da via das lectinas, como por exemplo, a MBL (Lectina ligadora de manose), que se mostrou deficiente em pacientes com LES. A MBL, junto a outros componentes do sistema imune, atua na remoção de restos celulares e na opsonização de bactérias (KYTTARIS, 2010).

Apesar de o LES geralmente ter sido estudado como uma desregulação da imunidade adaptativa envolvendo células B e T, hoje são crescentes as evidências de que a imunidade inata também está envolvida e que células dendríticas, macrófagos e neutrófilos contribuem para a patogênese do LES (APOSTOLIDIS et al., 2011). Monócitos e macrófagos de pacientes com LES têm mostrado uma capacidade reduzida de fagocitose de material apoptótico, a qual pode contribuir com o desenvolvimento da autoimunidade (PATHAK; MOHAN, 2011). KILMON et al. (2007) demonstraram que macrófagos regulam a tolerância dos linfócitos B através da secreção de fatores de regulação IL-6 e CD40L, no entanto macrófagos de camundongos propensos ao desenvolvimento do Lúpus apresentam redução da expressão desses fatores e são incapazes de reprimir a secreção de imunoglobulinas dos linfócitos B, indicando uma possível relação dos macrófagos com a hiperatividade dos linfócitos B no LES.

Todos esses mecanismos juntos levam a um ciclo patogênico, no qual tanto imunidade inata e adaptativa com seus diferentes componentes e células cooperam e respondem aos estímulos uma da outra para estabelecer a patogênese do LES.

2.1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS DO LES

O desenvolvimento do LES apresenta diferentes fases. Na primeira fase, o sistema imune ainda está em equilíbrio, mas com uma genética predisponente à autoimunidade. Na segunda fase, uma resposta imunológica anormal ocorre, porém manifestações clínicas ainda não foram estabelecidas, sendo chamada autoimunidade pré-clínica. Nessa fase,

autoanticorpos e células anormais já podem ser evidenciadas e tendem a aumentar durante os meses e anos seguintes, levando aos sintomas clínicos iniciais e, conseqüentemente, ao diagnóstico da doença (TÓBON et al., 2012).

Sendo o LES uma doença sistêmica, vários órgãos e sistemas são acometidos ao mesmo tempo (ASSIS; BAAKLINI, 2009). Na figura 2, estão representados os principais órgãos e sistemas atingidos pelo desenvolvimento da doença.

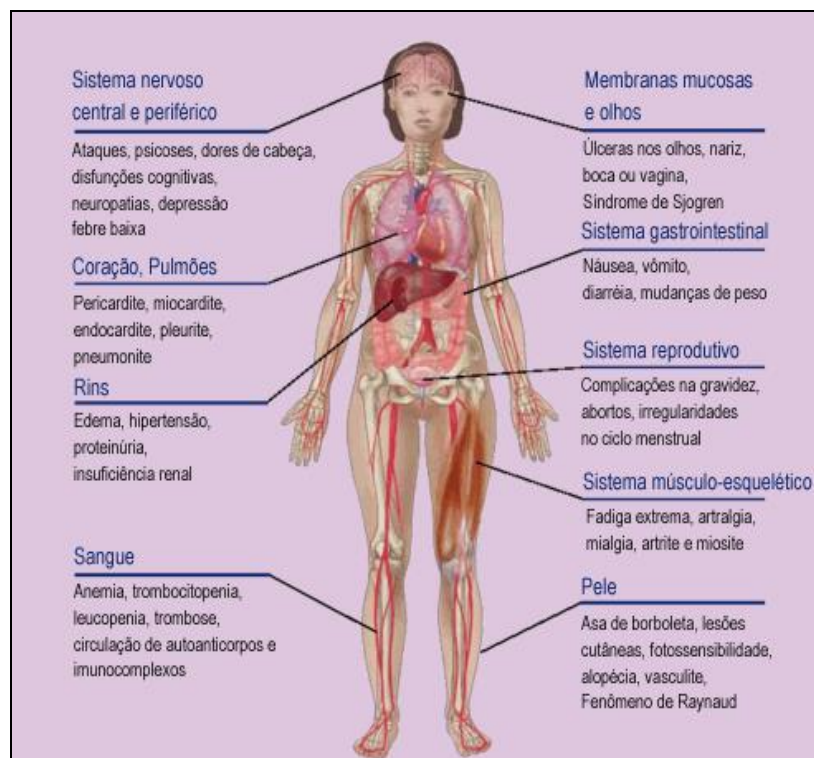


Figura 2. Manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com LES, envolvendo os diferentes órgãos e sistemas (Fonte: www.misodor.com/LUPUS.html).

As principais manifestações clínicas ocorrem na pele e nos sistemas nervoso, renal, sanguíneo e imunológico. Tais manifestações clínicas podem variar em grande escala, com acometimentos concomitantes, aditivos ou sequenciais, cíclicos ou persistentes, agudos ou crônicos e com períodos de remissão, atividade e progressão da doença relativos a órgãos e sistemas diferentes. O período de remissão é muito variável e pode durar semanas, meses ou até anos; o período de atividade geralmente é uma exacerbação dos sintomas já estabelecidos; e a progressão é caracterizada pelo aparecimento de novos sintomas. Fatores como estresse, infecções, exposição excessiva ao sol, causas emocionais ou interrupção do tratamento são

possíveis motivos para o reestabelecimento da atividade da doença (ROBINSON; COOK; CURRIE et al., 2011).

O padrão inicial da doença habitualmente exhibe sintomas gerais inespecíficos, como mal-estar, fadiga, febre baixa, perda de peso e adenomegalia e costuma evoluir com manifestações cutâneas e articulares, alterações hematológicas e sorológicas (ASSIS; BAAKLINI, 2009).

As manifestações cutâneas levam a um potencial diagnóstico do Lúpus através de quatro critérios: rash malar, fotossensibilidade, rash discoide e alopecia. O rash malar, também conhecido com lesão em asa de borboleta (Figura 3), é caracterizado por uma erupção eritematosa sobre as bochechas e o nariz, a qual pode durar de dias a semanas e ocasionalmente ser dolorosa e com prurido. Esse tipo de lesão ocorre em 30% dos pacientes com LES (COJOCARU et al., 2011) e está fortemente associado à fotossensibilidade (ASSIS; BAAKLINI, 2009). A fotossensibilidade é responsável pela formação de erupções cutâneas devido à exposição à luz ultravioleta, principalmente na face, nos braços e mãos (Figura 4) (UVA et al., 2012).



Figura 3. Rash malar ou lesão em asa de borboleta – uma das principais lesões dermatológicas dos pacientes com LES (Fonte: UVA et al., 2012).



Figura 4. Erupções cutâneas causadas pela exposição à luz ultravioleta (Fonte: UVA et al., 2012).

O rash discoide (Figura 5) muitas vezes é desenvolvido em áreas expostas ao sol (COJOCARU et al., 2011) e é caracterizado por placas arredondadas, avermelhadas e com tamanhos variáveis. O crescimento dessas lesões ocorre de forma centrífuga, podendo haver fusão das placas, as quais geralmente aparecem na região do pescoço e cabeça, mas também podem atingir outras áreas como palmas das mãos e plantas dos pés (UVA et al., 2012).



Figura 5. Placas características do rash discoide (Fonte: Uva et al., 2012).

A alopecia é uma das características menos específicas do LES. Ocorre em torno de 45% dos pacientes em algum estágio da evolução da doença e muitas vezes é um dos primeiros sintomas a aparecer (UVA et al., 2012). Na maioria das vezes atinge as regiões temporais, mas também pode acometer barba, sobrancelhas e cílios (COJOCARU et al., 2011).

As lesões dermatológicas são muito frequentes e polimórficas, envolvendo pele, tecido capilar e mucoso, sendo mais de 85% dos pacientes afetados por essas lesões ao longo da evolução da doença (UVA et al., 2012). Aproximadamente 20% dos pacientes apresentam lesões cutâneas no início da doença (COJOCARU et al., 2011).

Pacientes com LES também podem apresentar manifestações vasculares, como por exemplo, vasculites cutâneas, as quais são observadas principalmente em vasos de pequeno calibre. A vasculite em pacientes com LES é mediada tanto pela deposição de imunocomplexos como pela ligação direta de anticorpos aos componentes celulares e, conseqüentemente, pela ativação do sistema complemento e inflamatório (UVA et al., 2012). Como uma das manifestações vasculares dos pacientes com LES, há também o Fenômeno de Raynaud (Figura 6), o qual se caracteriza por uma resposta vascular exagerada a baixas temperaturas e ao estresse emocional. Esse fenômeno é caracterizado pela mudança de cor nas pontas dos dedos, causada pela vasoconstrição anormal das arteríolas das digitais, sendo esse um processo reversível (UVA et al., 2012).



Figura 6. Alterações causadas pelo Fenômeno de Raynaud (Fonte: RIBEIRO et al., 2011)

Cerca de 90% dos pacientes apresentam dores articulares, ocorrendo frequentemente no início da doença (ASSIS; BAAKLINI, 2009). Artralgia, artrite e osteonecrose são as principais manifestações musculoesqueléticas no LES e podem envolver as articulações das

mãos, punhos e joelhos (COJOCARU et al., 2011). Geralmente, essas manifestações são não-erosivas, assimétricas, migratórias e moderadamente dolorosas (GOH; NAIDOO; NGIAN, 2012) (Figura 7).



Figura 7. Artrite desencadeada pelo LES (Fonte: RIBEIRO et al., 2011)

O envolvimento renal ocorre pelo menos em metade dos pacientes em algum momento do desenvolvimento da doença, contribuindo de forma significativa para a morbidade e mortalidade da doença, uma vez que 10% dos pacientes evoluem para insuficiência renal crônica em cinco anos (ASSIS; BAAKLINI, 2009). As manifestações renais podem se manifestar de forma leve, apresentando proteinúria, ou como uma forma mais grave, com uma glomerulonefrite aguda ou crônica. A glomerulonefrite lúpica é consequência da deposição de imunocomplexos no glomérulo (GOH; NAIDOO; NGIAN, 2012).

O LES também pode acometer o sistema cardiovascular em 58 a 77% dos pacientes em algum momento do seu curso, sendo que raramente ocorre como primeira manifestação da doença ou isoladamente (GOH; NAIDOO; NGIAN, 2012). Pode afetar o pericárdio, o miocárdio, as válvulas cardíacas e as artérias coronárias (LALANI et al., 2004). A pericardite é uma das manifestações cardíacas do LES mais comum, inclusive sendo um dos critérios de inclusão usados para o diagnóstico da doença na classificação da Sociedade Americana de Reumatologia (ACR) (TAN et al., 1982; GLADMAN et al. 1996; HOCHBERG, 1997). Autópsias em pacientes com LES revelam que a pericardite ocorre em mais de 60% dos casos, porém apenas 25% a manifestam clinicamente. A miocardite é uma manifestação menos comum, sendo muitas vezes clinicamente silenciosa, podendo estar associada com um processo inflamatório contra o músculo estriado, resultando em um dano ao miocárdio (GOH; NAIDOO; NGIAN, 2012).

Manifestações neurológicas são relatadas em 25 a 70% dos pacientes com LES, podendo afetar qualquer parte do sistema nervoso (COJOCARU et al., 2011). Pela classificação da ACR (TAN et al., 1982; GLADMAN et al. 1996; HOCHBERG, 1997), podem ocorrer diversos comprometimentos do sistema nervoso central como: estado confusional agudo, disfunção cognitiva, psicose, distúrbios do humor, distúrbios da ansiedade, cefaléia, doença cerebrovascular, mielopatia, distúrbios do movimento, síndromes desmielinizantes, convulsões e meningite asséptica; assim como distúrbios do sistema nervoso periférico tais como: neuropatia cranial, polineuropatia, plexopatia, mononeuropatia simples ou múltipla, polirradiculoneuropatia aguda inflamatória desmielinizante (síndrome de Guillain-Barré), distúrbio autonômico e miastenia gravis (ASSIS; BAAKLINI, 2009). O envolvimento do sistema nervoso central também é uma das causas de mortalidade e morbidade em pacientes com LES (GOH et al., 2012), sendo as dores de cabeça e transtornos de humor as principais manifestações neurológicas relatadas (COJOCARU et al., 2011).

O envolvimento do sistema respiratório no LES é bastante comum, entre 40 a 57% dos pacientes apresentam sintomas de dispneia e pouca tolerância a exercícios físicos. Esses sintomas muitas vezes são consequência de um processo patológico em outro órgão, como por exemplo, o edema pulmonar que é decorrente da falência renal (LALANI et al., 2004).

A pleurite ocorre em mais de 60% dos indivíduos com LES e geralmente se manifesta como um derrame pleural bilateral e recorrente. Biópsias revelam a presença de vários depósitos de imunoglobulinas, imunocomplexos e linfócitos e a ocorrência de fibroses (GOH; NAIDOO; NGIAN, 2012). Os pacientes com LES têm alto risco de infecção pulmonar devido ao tratamento com imunossupressores (LI; ISENBERG, 2006). Infecções nos brônquios é a causa mais comum de infiltrado pulmonar, sendo responsável por mais de 50% das infecções fatais nesses pacientes. Há também a pneumonia lúpica aguda ou crônica, a qual tem características similares à bronquiopneumonia, com a diferença de não apresentar um patógeno causador da doença (GOH; NAIDOO; NGIAN, 2012).

Alguns sintomas gastrointestinais secundários ao LES e como efeitos adversos do tratamento da doença também são comuns entre os pacientes: ulcerações orais é uma manifestação clínica comum da doença, sendo inclusive um dos critérios determinados pelo ACR (TAN et al., 1982; GLADMAN et al. 1996; HOCHBERG, 1997) para o diagnóstico da doença (COJOCARU et al., 2011). A prevalência dessas lesões é de 7 a 52%, variando bastante no tipo de lesão (UVA et al., 2012). Dores abdominais não específicas são vistas em

10 a 37% dos pacientes (LALANI et al., 2004) e são significativas, uma vez que podem estar diretamente associadas com peritonite, pancreatite, vasculites mesentéricas e infarto do tecido intestinal (COJOCARU et al., 2011).

Ao longo da evolução do LES, mais da metade dos casos desenvolverão manifestações hematológicas (ASSIS; BAAKLINI, 2009). O lúpus em atividade é frequentemente caracterizado por anemia, leucopenia, linfopenia e trombocitopenia, provavelmente pelos efeitos não específicos da inflamação sobre a função da medula óssea, assim como pela produção de autoanticorpos específicos para os elementos celulares (SASIDHARAN; BINDYA; SAJEETH, 2012).

Como uma das principais características do LES, há a formação de autoanticorpos contra uma grande variedade de componentes celulares (ARBUCKLE et al., 2003; KYTTARIS, 2010). Um dos mais frequentes é o anticorpo antiDNA, o qual pode ser contra o DNA de dupla fita (anti-dsDNA) ou contra o DNA de fita simples, podendo estar presente em 70 a 80% dos pacientes com LES. Outro exemplo são os anticorpos antinucleossomais, os quais se dirigem contra proteínas que compõem os nucleossomos. Sua positividade isolada é marcadora de lúpus eritematoso desencadeado por drogas e, quando associado ao anti-dsDNA, indica doença lúpica sistêmica (DUARTE A.A, 2005; VARGAS K.S.; ROMANO M.A. 2009).

Há também os anticorpos antiSm e antiRNP, dirigidos contra os polipeptídeos envolvidos na síntese de RNA, Smith e RNP, respectivamente. O antiRNP está presente no LES em proporções de 30 a 40% e pode estar associado a outros quadros autoimunes, enquanto o antiSm é considerado um autoanticorpo específico e marcador de LES e apresenta positividade em percentuais que variam de 20 a 30% dos pacientes. Também podem ser encontrados os anticorpos antiRo/SSA e antiLa/SSB, os quais são anticorpos contra as ribonucleoproteínas, ou seja, proteínas que fazem parte da composição do RNA. O antiRo/SSA está presente em torno de 40% dos pacientes com LES e, comumente, está associado à presença do antiLa/SSB (DUARTE A.A, 2005; VARGAS K.S.; ROMANO M.A. 2009).

Um dos principais autoanticorpos no LES é o anticorpo antifosfolípido. Esse anticorpo age diretamente contra os componentes da membrana da célula, interferindo no processo de coagulação e na função das células endoteliais, tendo como consequência um aumento na expressão de moléculas de adesão na superfície das células e a indução da

produção de fator tissular, causando agregação plaquetária e a formação de trombos. Esses eventos são chamados de Síndrome do Anticorpo Antifosfolípídeo, a qual muitas vezes é responsável por abortos espontâneos em gestantes com essa síndrome (RUIZ-IRASTORZA et al., 2010). Já os anticorpos antiplaquetas podem reduzir o número de plaquetas e causar a chamada trombocitopenia imune, levando a sangramentos (KYTTARIS, 2010).

Apesar da presença desses autoanticorpos ser uma característica constante na doença, a sua concentração e diversidade variam entre os pacientes. Existe também uma relação entre a associação desses autoanticorpos com a fase de atividade da doença e as manifestações clínicas do paciente: níveis elevados do autoanticorpo anti-dsDNA foi associado à exacerbação da doença e, junto ao anticorpo anti-Sm, foi também associado com a nefrite lúpica (SHERER et al., 2004; MANSON et al., 2009). O autoanticorpo anti-Ro/SSA foi associado à trombocitopenia e ao lúpus neonatal e o autoanticorpo antiproteína P ribossomal, à nefrite e ao acometimento do sistema nervoso central em pacientes com LES. Em contraste, vários outros autoanticorpos não apresentam nenhuma relação comprovada com os sintomas clínicos dos pacientes (SHERER et al., 2004).

Os autoanticorpos também podem variar na especificidade ao LES. O autoanticorpo antiproteína P ribossomal é altamente específico ao LES, enquanto outros autoanticorpos, como o antifosfolípídeo e o anti-DNA, são encontrados em outras doenças autoimunes (SHERER et al., 2004).

O aparecimento desses autoanticorpos pode preceder os sintomas clínicos por vários anos e o seu repertório aumentar de maneira progressiva (KYTTARIS, 2010). Essas imunoglobulinas participam da deposição de imunocomplexos, causando a ativação do sistema complemento e o aumento da atividade inflamatória por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias e do influxo de células mononucleares e neutrófilos (LI; ISENBERG, 2006).

Um dos principais testes utilizados para o rastreamento dos autoanticorpos é o teste do Fator Antinuclear (FAN), o qual pesquisa os anticorpos antinucleares (ANA) encontrados no LES, mas também pode detectar a presença de autoanticorpos contra elementos do citoplasma e do nucléolo da célula. No LES, o FAN é positivo em quase 100% dos pacientes e, além de indicar a presença dos autoanticorpos, também tem caráter semiquantitativo, uma vez que indica, através do título encontrado, a concentração de autoanticorpos no soro do paciente. Esse teste pode sugerir quais as possíveis especificidades de autoanticorpos presentes e

indicar as próximas etapas da investigação laboratorial dos autoanticorpos envolvidos (VARGAS K.S.; ROMANO M.A. 2009).

O diagnóstico do lúpus é estabelecido através dos critérios de classificação do ACR (TAN et al., 1982; GLADMAN et al. 1996; HOCHBERG, 1997), que se baseia na presença de pelo menos 4 entre os 11 critérios mostrados na Tabela 2. A presença desses critérios pode diagnosticar o paciente como portador da doença com 95% de especificidade e 85% de sensibilidade (LOUIS; FERNANDES, 2001).

Tabela 2. Critérios para diagnóstico do LES de acordo com a Sociedade Americana de Reumatologia.

Critério	Definição
1. Rash malar	Eritema fixo, plano ou elevado, sobre a região malar.
2. Rash discoide	Manchas eritematosas elevadas com placas ceratóticas aderentes. Cicatrizes atróficas podem ocorrer em lesões antigas.
3. Fotossensibilidade	Rash resultante de reação incomum à luz do sol, por história do paciente ou observação do médico.
4. Úlceras orais	Úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente dolorosas.
5. Artrite	Artrite não erosiva, envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizada por sensibilidade, edema ou derrame articular.
6. Serosite	Pleurite, história de dor pleurítica, atrito auscultado por um médico ou evidência de derrame pleural; pericardite documentada por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico.
7. Doença renal	Proteinúria persistente, maior que 0,5 g/24h ou maior do que 3+ se não é realizada a quantificação; cilindros celulares: hemáticos, granulares, tubulares ou mistos.
8. Doença neurológica	Convulsões na ausência de drogas ou distúrbios metabólicos que possam desencadear a crise; psicose na ausência de drogas ou distúrbios metabólicos que possam desencadear a crise.
9. Alterações hematológicas	Anemia hemolítica com reticulocitose; leucopenia caracterizada por menos de 4000 leucócitos/mm ³ em duas ou mais ocasiões; linfopenia caracterizada por menos de 1500 linfócitos/mm ³ em duas ou mais ocasiões; trombocitopenia caracterizada por menos de 100.000 plaquetas/mm ³ na ausência de drogas plaquetopênicas.
10. Alterações imunológicas	Anticorpo anti-DNA nativo positivo; anticorpo anti-Sm positivo; presença de anticorpo antifosfolípido, baseado em níveis séricos anormais de anticardiolipina IgG ou IgM; anticoagulante lúpico positivo por um método padrão; teste sorológico positivo para sífilis por pelo menos 6 meses e confirmado por FTA-ABS negativo.
11. Anticorpo antinuclear (FAN)	Títulos anormais por imunofluorescência ou teste equivalente em qualquer momento na ausência de drogas conhecidas como “indutoras de lúpus”.

Fonte: TAN et al., 1982; GLADMAN et al. 1996; HOCHBERG, 1997.

2.1.4 O LES E OS FATORES AMBIENTAIS

Embora os fatores que contribuem para a patogenia da doença não estejam completamente esclarecidos, alguns fatores ambientais são considerados importantes no desencadeamento do LES (D'CRUZ; KHAMASHTA; HUGHES, 2007). A luz ultravioleta (UV) é considerada um dos principais fatores ambientais envolvidos na exacerbação da doença. Quando os queratinócitos são expostos à luz UV, o seu DNA sofre danos, causando a apoptose da célula e, conseqüentemente, liberação do material nuclear. Nos pacientes com LES, esse material não é removido de forma adequada, o que desencadeia uma resposta inflamatória e, como consequência, pode influenciar no aparecimento das manifestações cutâneas desses pacientes (COOPER et al., 2008).

Outro fator ambiental considerado indutor do LES é o uso de drogas como, por exemplo, a hidralazina e a procainamida. Essas drogas inibem a metilação do DNA, o que pode causar a diminuição da produção de citocinas por células T CD4⁺ e a hiperprodução de IgG por determinados tipos de linfócitos B, desordenando o sistema imune e, conseqüentemente, induzindo o desenvolvimento do LES em um indivíduo geneticamente predisposto (CRISPÍN et al., 2010). Pacientes com lúpus induzido por drogas podem apresentar alguns autoanticorpos, tais como o antifosfolípido e o anti-histona. Esse tipo de lúpus geralmente permanece por 4 a 6 semanas após a interrupção do uso do medicamento, porém a detecção de autoanticorpo antinuclear (ANA) pode permanecer positivo por 6 a 12 meses. Apesar dessas drogas serem capazes de induzir a doença, parecem não agravar o LES estabelecido previamente (LOUIS; FERNANDES, 2001).

Uma vez que os vírus apresentam propriedades de mimetismo molecular e suas proteínas podem causar reação cruzada com antígenos próprios, infecções virais têm sido consideradas possíveis desencadeadoras do LES. Como exemplo, há a proteína EBNA-1 do Epstein- Barr vírus (EBV), a qual apresenta reação cruzada com o autoantígeno Ro, um dos principais alvos da resposta imunológica na doença. A alta prevalência de EBV na população adulta dificulta qualquer conclusão, porém foi observado que alguns pacientes com LES apresentavam anticorpos para proteínas de EBV antes do desenvolvimento de autoanticorpos característicos do LES (DRABORG; DUUS; HOUEN, 2012).

Sendo a maioria dos pacientes com LES do sexo feminino, parece provável que exista um importante papel dos hormônios femininos no desencadeamento da doença (MASON;

ISENBERG, 2003), ou algum efeito dos genes do cromossomo X ou ainda um papel protetor dos hormônios masculinos (RAHMAN; ISENBERG, 2008). Foi observado que a administração dos hormônios estrogênio e prolactina levou ao aumento de linfócitos B autorreativos em animais murinos e acelerou o desenvolvimento do LES em cobaias propensas a doença (COHEN-SOLAL et al., 2008). A administração de hormônios, como por exemplo, o uso de contraceptivos e reposição hormonal, mostrou ter influência no desenvolvimento do LES, apesar de apresentar resultados contraditórios (D'CRUZ; KHAMASHTA; HUGHES, 2007).

Assim como os hormônios, foi demonstrado que os cromossomos sexuais também podem influenciar diretamente na susceptibilidade ao desenvolvimento do LES. SMITH-BOUVIER et al. (2008), analisando o desenvolvimento do LES em animais murinos no quais o gene *Sry* é adicionado no cromossomo X ou deletado do cromossomo Y, observaram diferenças na susceptibilidade ao LES influenciadas pelos cromossomos sexuais. O gene *Sry* é responsável pela diferenciação das células das gônadas em células de Sertoli, as quais dão início a formação dos testículos e, conseqüentemente, diferenciam homens de mulheres. O uso desses murinos permite avaliar o efeito dos cromossomos sexuais com ou sem a interferência do componente hormonal. Foi observado que em cobaias gonadectomizadas e manipuladas geneticamente para expressar XX ou XY^{-Sry} nas fêmeas e XX^{Sry} ou XY^{-Sry} nos machos, o desenvolvimento de lúpus induzido pelo óleo mineral pristano mostrou-se mais severo nas fêmeas XX quando comparadas às XY^{-Sry} e nos machos XX^{Sry} quando comparados aos XY^{-Sry} (SMITH-BOUVIER et al., 2008).

2.1.5 A GENÉTICA DO LES

Estudos familiares apontam para uma forte influência genética no desenvolvimento do LES com uma taxa de herdabilidade maior que 66% e uma alta taxa de concordância de 23 a 57% em gêmeos monozigóticos contra uma taxa de 2 a 5% entre gêmeos dizigóticos (DENG; TSAO, 2010). Outro estudo também mostrou uma prevalência do LES em parentes de primeiro grau cerca de 10 vezes maior do que em grupos controles (LI; ISENBERG, 2006).

A genética do LES é complexa, uma vez que a maioria dos estudos demonstram que nenhum gene em particular atuando sozinho é capaz de levar ao desenvolvimento da doença,

sendo mais provável a contribuição de vários genes atuando em conjunto para determinar a susceptibilidade ao LES (CRISPIN et al., 2009).

Estudos de associação genômica em larga escala (GWAS) e estudos de associação do tipo caso-controle vêm sendo utilizados na tentativa de determinar a predisposição genética ao LES. A grande maioria dos genes estudados e associados ao desenvolvimento do LES faz parte da resposta imune inata ou adaptativa (DELGADO-VEGA et al., 2010).

A região cromossômica 6p21 a qual compreende o complexo de histocompatibilidade humano (HLA) e codifica mais de 200 genes, a maioria com funções imunológicas, foi a primeira associação genética descrita no LES (GOLDBERG et al., 1976). DENG; TSAO (2010) realizaram estudos de associação genômica em larga escala em populações europeias e asiáticas e mostrou que a região do HLA apresenta uma forte contribuição no risco de desenvolvimento do LES com múltiplos efeitos genéticos. A maioria dos genes do HLA estudados até hoje são de classe II, como exemplo, o *HLA-DR2* e o *HLA-DR3*, os quais mostraram consistentes associações com o LES em várias populações europeias, com o dobro do risco de desenvolvimento da doença para cada alelo (TSAO, 2003). A associação desses genes com o LES também foi confirmada em populações asiáticas (LEE et al., 2003).

Diversos outros genes, os quais codificam proteínas com funções diversas no sistema imunológico, também mostraram ter associação com a susceptibilidade ao LES: O gene *IRF5* (Fator regulador de interferon 5) codifica o principal fator de transcrição na via do IFN tipo I, regulando genes dependentes do IFN, citocinas inflamatórias e genes envolvidos na apoptose. Esse gene apresenta polimorfismos associados com o risco de desenvolvimento do LES, os quais foram relacionados com alterações na sinalização celular mediada pelo fator de transcrição IRF5, incluindo o aumento da expressão do RNAm do gene *IRF5* e de quimiocinas induzidas pelo IFN (GRAHAM et al., 2006; GRAHAM et al., 2007; DEMIRCI et al., 2007; SHIN et al., 2007; KAWASAKI et al., 2008a; SIU et al., 2008; KELLY et al., 2008; SIGURDSSON et al., 2008a; LOFGREN et al., 2010).

O gene que codifica a proteína STAT4 (Sinal de transdução e ativação de transcrição 4) tem sido associado com o LES em várias populações da Europa e da Ásia. Em vários estudos realizados, o polimorfismo rs7574865, presente no seu terceiro íntron, mostrou-se associado com um maior risco de desenvolvimento ao LES e com um quadro mais severo da doença caracterizado pelo seu aparecimento precoce, alta frequência de nefrite e presença de

anticorpos anti-dsDNA (REMMERS et al., 2007; TAYLOR et al., 2008; PALOMINO-MORALES et al., 2008; KAWASAKI et al., 2008b; SIGURDSSON et al., 2008b).

O gene *PTPN22* (Proteína tirosina fosfatase, não-receptor tipo 22), que codifica uma proteína que inibe a atividade de linfócitos T, apresenta um polimorfismo de base única não sinônimo (rs2476601) que está associado com a susceptibilidade a diversas doenças autoimunes, incluindo o LES (GREGERSEN; OLSSON, 2009). Estudos confirmaram essa associação em populações de descendentes de europeus, mas não em asiáticos, provavelmente devido à grande variedade alélica entre essas populações (HAN et al., 2009; YANG et al., 2010). Esse polimorfismo causa a substituição de um aminoácido que aumenta a atividade intrínseca da proteína, reduzindo a sinalização desencadeada pelos receptores de células T, o que pode induzir a autoimunidade através de alterações na seleção de linfócitos autorreativos e redução da atividade e do número de Tregs (VANG et al., 2005; RIECK et al., 2007; SIGGS et al., 2007). Em contraste, outra variante desse gene (rs33996649), a qual reduz a atividade da proteína, mostrou ter um papel protetor contra o LES (ORRÚ et al., 2009).

Outros genes associados ao LES são *FCGR2A* (Receptor Fc gama IIA), *FCGR3A* (Receptor Fc gama IIIA), *FCGR2B* (Receptor Fc gama IIB) e *FCGR3B* (Receptor Fc gama IIIB) que codificam os receptores Fc γ , os quais reconhecem imunocomplexos e estão envolvidos na resposta à presença de anticorpos. Diversas variantes funcionais nesses genes foram identificadas como fatores de risco para o LES, tais como: o polimorfismo não sinônimo rs1801274 do *FCGR2A*, o qual foi associado com uma baixa afinidade desse receptor a partículas opsonizadas por IgG2 e com a redução da remoção de imunocomplexos (DENG; TSAO, 2010); variantes no *FCGR3A* (rs396991) que alteram a afinidade de ligação desse receptor a imunocomplexos que contenha IgG1, IgG3 ou IgG4, reduzindo a remoção desses imunocomplexos (MAGNUSSON et al., 2004); um polimorfismo no domínio transmembrânico do *FCGR2B* que altera a função inibitória do receptor Fc γ RIIb de células B, causando alterações na inibição da ativação dessas células e, como consequência, promovendo a autoimunidade (KYOGOKU et al., 2002; SIRIBOONRIT et al., 2003; CHU et al., 2004); e o baixo número de cópias do *FCGR3B* que é frequente em pacientes com LES e parece estar associado com uma diminuição da expressão do receptor e da remoção dos imunocomplexos (FANCIULLI et al., 2007; WILLCOCKS et al., 2008).

O gene *CTLA-4* (Antígeno de linfócito T citotóxico 4) vem sendo descrito como um dos mais importantes genes de susceptibilidade a doenças autoimunes. A proteína codificada

por esse gene é expressa na superfície de linfócitos T ativados com uma função regulatória inibitória sobre essas células (TEFT; KIRCHHOF; MADRENAS, 2006). Os polimorfismos do *CTLA-4* mais estudados e considerados como associados ao LES em diferentes populações são T>C na posição -1722, C>T na posição -138 e A>G na posição +49 do éxon 1 (LIU et al., 2001; HUDSON et al., 2002; FERNANDEZ-BLANCO et al., 2004; BARRETO et al., 2004; LEE; HARLEY; NATH, 2005; ULKER et al., 2009; TAHA KHALAF et al., 2011).

Outro exemplo é o gene *TREX1* (Exonuclease de reparação 1), que codifica a principal DNA exonuclease 3'-5'. Essa enzima, além de revisar a DNA polimerase, também atua degradando o DNA durante a apoptose (STETSON et al., 2008). Quando essa enzima está deficiente, há uma remoção inadequada do DNA, induzindo a produção de IFN e uma resposta inflamatória e, conseqüentemente, auxiliando a autoimunidade. Um estudo de associação entre esse gene e pacientes com LES do Reino Unido, Alemanha e Finlândia mostrou que mutações no *TREX1* estavam presentes em pacientes e ausentes em indivíduos saudáveis (LEE-KIRSCH et al., 2007).

A família dos ligantes TNFSF4 (Superfamília de fator de necrose tumoral 4) e seus receptores são expressos em células apresentadoras de antígenos e linfócitos T, respectivamente. A interação entre esses ligantes e seus receptores induz a produção de sinais coestimulatórios de ativação das células T, ativação e diferenciação de células B e a produção de IL-17 (ITO et al., 2006). Estudos de associação identificaram um haplótipo de risco no gene *TNFSF4* que se mostrou associado com o aumento da expressão da proteína, podendo causar predisposição ao LES. A associação desse gene com o LES foi demonstrado tanto em populações europeias como nas populações chinesa e argentina (CUNNINGHAME GRAHAM et al., 2008; HAN et al., 2009; DELGADO-VEJA et al., 2009).

O polimorfismo (rs13277113) localizado na região intergênica entre os genes *FAM167A* (Membro A da família com similaridade de sequência 167) e *BLK* foi associado com a redução da expressão do *BLK* e com o aumento da expressão do *FAM167A* em pacientes com LES (HOM et al., 2008). O polimorfismo rs2736340 localizado próximo ao rs13277113 no gene *BLK* também foi associado ao LES (HARLEY et al., 2008). Ambas associações foram encontradas nas populações europeias, chinesas e japonesas (HOM et al., 2008, ITO et al., 2009, YANG et al., 2010; ZHANG et al., 2010) O gene *BLK* codifica uma proteína tirosina cinase da família Src, a qual medeia a sinalização intracelular e influencia a proliferação, diferenciação e tolerância dos linfócitos B (DENG; TSAO, 2010).

Um estudo na população europeia encontrou a associação de polimorfismos no gene *BANK1* (Proteína de célula B com repetições de anquirina) com a susceptibilidade ao LES. Esse gene codifica uma proteína adaptadora que faz parte da ativação de células B (KOZYREV et al., 2008). Os polimorfismos rs10516487 (G>A), rs17266594 (T>C) e rs3733197 (G>A) nesse gene podem contribuir com a manutenção da ativação dos receptores de células B e, conseqüentemente, com a hiperatividade dessas células, comumente observada nos pacientes com LES (YOKOYAMA et al., 2002).

SANCHEZ et al. (2009) selecionou nove SNPs no gene *IL-18* e observou a associação da variante rs360719 (T>C) com um aumento significativo na expressão de RNAm em indivíduos portadores do alelo de risco C. Esse polimorfismo cria um sítio de ligação para um fator transcricional, desempenhando um importante papel na susceptibilidade ao LES e na expressão da IL-18.

Na última década, vários outros polimorfismos foram estudados em diferentes genes e associados com a susceptibilidade ao LES, como por exemplo, os genes *CRP* (Proteína C reativa) (1q21-q23) (RUSSEL et al., 2004), *DNASE1* (16p13.3) (SHIN et al., 2004), *ITGAM1* (Integrina alfa M 1) (16p11.2) (NATH et al., 2008), *TNFAIP3* (Proteína 3 induzida por fator de necrose tumoral alfa) (6q23) (GRAHAM et al., 2008), *IRAK1* (Cinase associada a receptor de interleucina 1) (Xq28) (JACOB et al., 2009), *PRDM1* (Domínio contendo 1 PR, com domínio ZNF) (6q21) (GATEVA et al., 2009; HAN et al., 2009) e *ETS1* (V-ets vírus da eritroblastose homólogo 1 do oncogene E2) (11q23.3) (HAN et al., 2009; YANG et al., 2010). A figura 8 a seguir mostra os diversos genes associados ao LES com suas respectivas localizações cromossômicas e função:

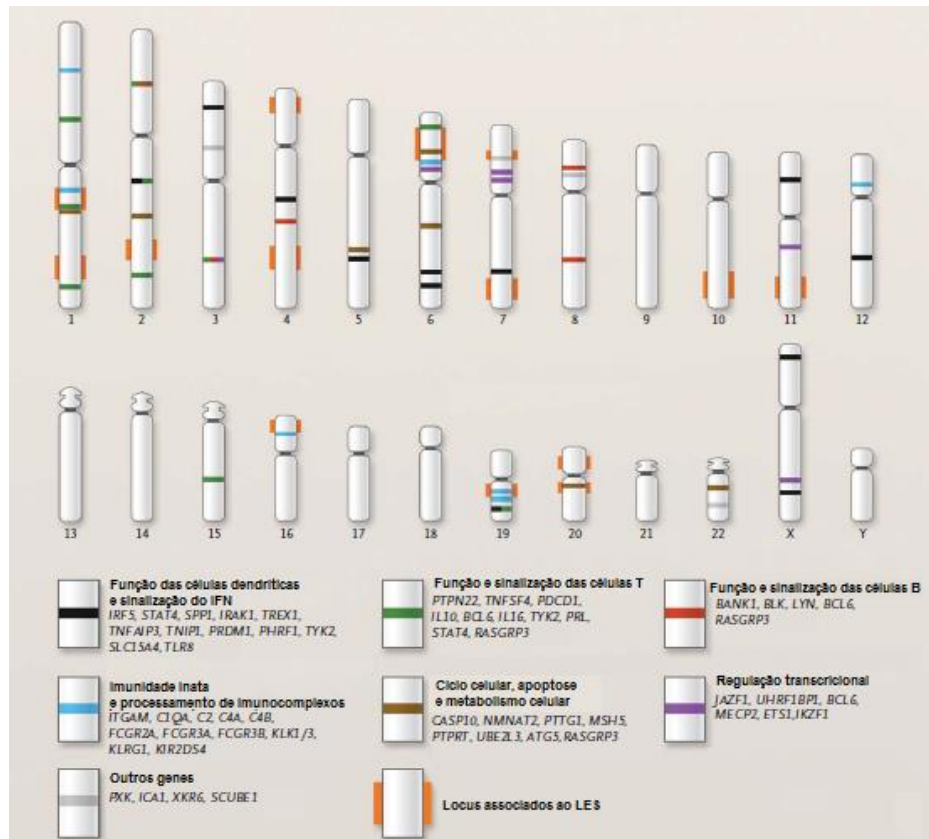


Figura 8. Genes associados ao desenvolvimento do LES com suas respectivas localizações cromossômicas e funções (Fonte: adaptada de Tsokos, GC, 2011).

Além de estudos genéticos de associação de polimorfismos com o desenvolvimento do LES, estudos de expressão gênica também vêm sendo realizados para a identificação de genes candidatos que possam ser úteis para o entendimento da patogênese, diagnóstico e prognóstico do LES: SANDRIN-GARCIA et al. (2009) avaliaram o perfil de expressão gênica de 4500 genes comparando pacientes com LES nas fases ativa e inativa da doença e controles saudáveis. Um total de 156 genes mostrou-se diferencialmente expresso quando comparados os pacientes aos controles. Desses 156 genes, 104 estavam relacionados aos pacientes com LES em atividade, sendo 80 reprimidos e 24 induzidos, e 52 estavam relacionados com os pacientes na fase de inatividade da doença, sendo 31 induzidos e 21 reprimidos. Entre esses genes, estão o *FYB* (Proteína ligante de Fyn), *FYN* (Fyn tirosina cinase), *SEMA4A* (Semaforina 4A), *STK17A* (Serina treonina cinase 17 A), *SLC38A1* (Membro 1 da família carreadora de soluto 38), *PGBD3* (Derivado 3 do elemento transponível PiggyBac), *PANK1* (Cinase pantotenato 1), *CSNK1G3* (Caseína cinase 1 gama 3) e *VPS4B* (Proteína vacuolar homóloga a 4B).

2.1.5.1 GENE *FYB*

O gene *FYB* (Proteína Ligante de Fyn) está localizado no cromossomo 5 (5p13.1) e codifica a proteína Fyb, também chamada de ADAP (Proteína adaptadora promotora de adesão e degranulação) ou SLAP-130 (Proteína associada a SLP-76 de 130kD). Esse gene apresenta uma região codificadora constituída por 20 exons distribuídos em 169.293 pares de base (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.1.5.1.1 PROTEÍNA *FYB*

A Fyb é uma proteína adaptadora que faz parte da cascata de ativação de linfócitos T. Essa proteína, além de ser expressa nos linfócitos T, também é expressa por plaquetas, macrófagos, células NK (Natural Killer) e mastócitos (WANG; RUDD, 2008).

Após o reconhecimento de antígenos pelo TCR (Receptor de célula T), há o início de uma sequência de sinais bioquímicos que resultam na ativação das células T. Os primeiros eventos incluem a ativação de tirosinas cinases (enzimas que catalisam a fosforilação de tirosinas de outras proteínas) associadas ao complexo CD3 e a proteína ζ , os quais fazem parte do complexo TCR (WEISS; LITTMAN, 1994).

O complexo CD3 e a proteína ζ contêm em sua cauda citoplasmática os ITAMs (Imunorreceptor com motivos de ativação baseado em tirosina), os quais são formados por sequências repetidas de 4 aminoácidos, entre eles a tirosina. Quando o TCR se liga ao complexo peptídeo-MHC das células apresentadoras de antígenos (APC), tirosinas cinases se aproximam desses ITAMs fosforilando-os. O principal exemplo dessas tirosinas cinases é a Lck (Proteína tirosina cinase específica de células linfocitárias), a qual é ativada provavelmente por alterações conformacionais das moléculas do TCR após a sua ligação à APC (BARBER et al, 1989; WEISS; LITTMAN, 1994).

Os ITAMs fosforilados na cadeia ζ tornam-se pontos de atração para a tirosina cinase ZAP-70 (Proteína cinase associada a cadeia ζ de 70kDa), que ao se ligar às tirosinas fosforiladas dos ITAMs, torna-se um substrato para a Lck, permitindo a sua fosforilação (WEISS; LITTMAN, 1994). Quando fosforilada, a ZAP-70 adquire sua atividade de tirosina cinase, tornando-se capaz de fosforilar as tirosinas da LAT (Linker para ativação de células T), a qual recruta a GADS (Grb2 relacionados ao adaptador de Shc), que se liga à SLP-76

(Proteína leucocitária de 76 kDa contendo o domínio homólogo a Src 2). Esse complexo recruta tanto a cinase ITK (Cinase de células T indutora de interleucina 2), a qual é necessária para a fosforilação da PLC γ 1 (Fosfolipase C isoforma γ 1) e para a mobilização de cálcio intracelular, como as proteínas Fyb (Proteína ligante de Fyn) e SKAP-55 (Proteína associada a cinase src de 55 kDa) (Figura 9) (RUDD, 1999; SAMELSON, 2002; CLEMENTS et al, 1999; SCHWARTZBERG; FINKELSTEIN; READINGER, 2005).

A Fyb possui resíduos de aminoácidos que, quando fosforilados, tornam-se pontos de ligação para a SLP-76 (RAAB et al, 1999) e para SKAP-55 (LIU et al, 1998; KANG et al, 2000; MARIE-CARDINE et al, 1998a; MARIE-CARDINE et al, 1998b). A fosforilação da Fyb é regulada pela cinase Fyn (DA SILVA et al, 1997a; DA SILVA et al, 1997b; VEALE et al, 1999; RAAB et al, 1999; BOERTH; JUDD; KORETZKY, 2000).

A fosforilação em cascata e consequente ativação dessas moléculas de sinalização levam ao recrutamento específico de enzimas-chave que iniciam, cada uma, vias de sinalização distintas e adjacentes. Os detalhes dos eventos moleculares de cada uma dessas vias não estão elucidados, mas já se sabe que eles culminam na expressão de genes que codificam proteínas necessárias para a expansão clonal, diferenciação e funções efetoras das células T (TOGNI et al, 2004).

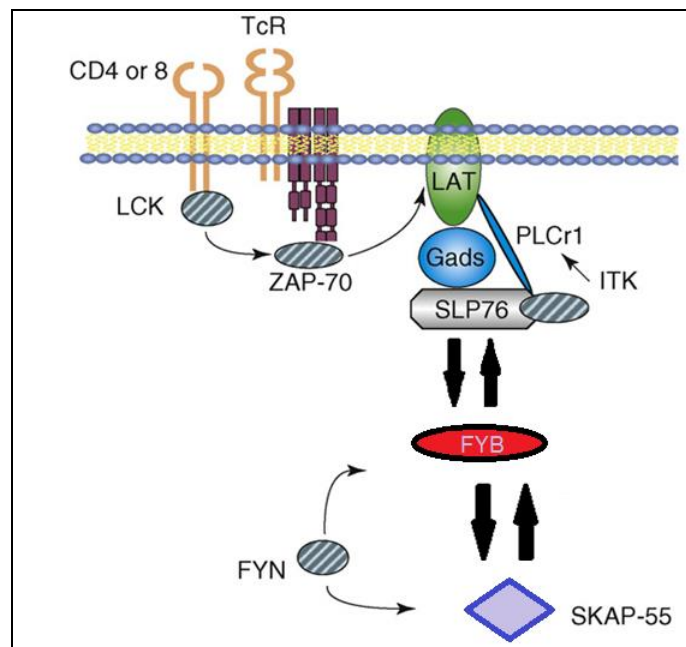


Figura 9: Interação das tirosinas cinases e das proteínas adaptadoras após estímulo do TCR (Fonte: Adaptada de WANG; RUDD, 2008).

Entre essas proteínas que são fosforiladas para atuarem na transdução de sinais para ativação dos linfócitos T, estão as proteínas adaptadoras, como por exemplo, as já citadas Fyb (MUSCI et al, 1997; DA SILVA et al, 1997a; DA SILVA et al, 1997b), LAT (ZHANG et al, 1999), GADS (YODER et al, 2001) e SLP-76 (CLEMENTS, 1998; PIVNIOUK et al, 1998). Essas proteínas, sem atividade enzimática ou de transcrição, desempenham um papel crucial na organização dos complexos moleculares envolvidos nessa transdução de sinais, chamados sinalossomos. Essas proteínas são subdivididas em moléculas adaptadoras transmembrânicas e moléculas adaptadoras citosólicas (TOGNI et al, 2004). Dentre as adaptadoras citosólicas, encontra-se a proteína Fyb, a qual mostrou-se envolvida em diferentes processos da ativação das células T: WU et al. (2006) avaliaram *in vivo* a seleção e o desenvolvimento de timócitos deficientes em Fyb e encontraram alterações tanto na seleção negativa como na seleção positiva dessas células.

Os timócitos são selecionados pelo processo de autotolerância do sistema imune de acordo com a intensidade do sinal de ativação gerado após a sua ligação com o antígeno apresentado pela APC: células que recebem um sinal muito fraco são eliminadas por negligência, uma vez que não são capazes de responder ao estímulo de um antígeno; células que desenvolvem um sinal moderado sofrem seleção positiva e amadurecem; e finalmente células que desenvolvem um sinal muito forte são eliminadas por seleção negativa, já que podem ser potenciais células autorreativas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Uma hipótese para as alterações encontradas na seleção positiva e negativa dos timócitos deficientes em Fyb seria que a sinalização desencadeada pela ligação do TCR ao antígeno seria atenuada e, como consequência, sinais que normalmente resultariam em seleção positiva, agora resultam em morte por negligência e sinais que desencadeariam seleção negativa devido a uma alta avides, agora resultam em seleção positiva (WU et al., 2006).

Para uma completa ativação de células T e consequente ganho de função efetora, é necessária uma estável conjugação entre o linfócito T e a APC. Essa interação é mediada pela ligação da integrina LFA-1 (Antígeno associado à função leucocitária 1), expressa na superfície das células T, com a ICAM-1 (Moléculas intracelulares de adesão 1), expressa na superfície das APCs. Para que ocorra essa ligação, as integrinas precisam ser convertidas para seu estado ativado através de uma mudança conformacional que aumenta sua afinidade e permite o seu agrupamento ao receptor, aumentando sua avides (Figura 10). Essa ativação pode ser induzida por, além de outros processos, sinais bioquímicos gerados pelo estímulo do

TCR, dos quais fazem parte as proteínas adaptadoras (LUO; CARMAN; SPRINGER, 2007; KINASHI, 2005; DUSTIN; SPRINGER, 1989).

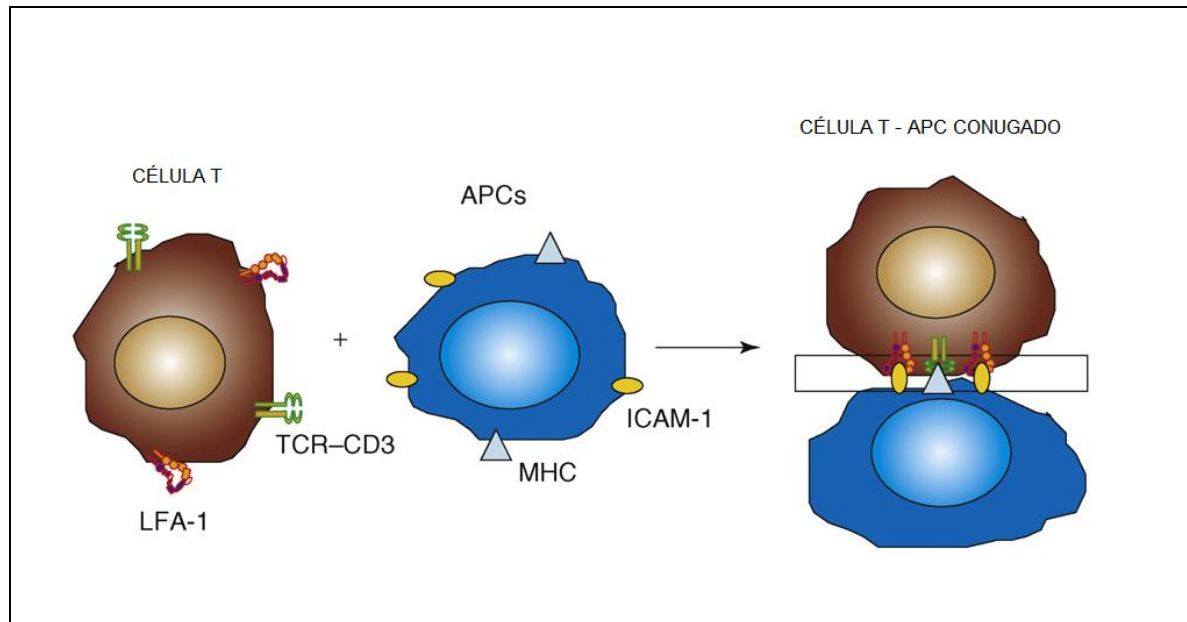


Figura 10: Formação do conjugado entre a célula T e a APC: com o estímulo do TCR, as integrinas sofrem alterações conformacionais que permitem o seu agrupamento ao receptor e sua ligação às ICAMs-1 da APC (Fonte: Adaptada de WANG; RUDD, 2008).

GRIFFITHS et al. (2001) mostraram que células T Fyb-deficientes apresentam um agrupamento de LFA-1 reduzido após o estímulo do TCR, sugerindo um possível papel da Fyb no acoplamento dos sinais gerados pelo TCR com a mobilidade da LFA-1 na membrana e, conseqüentemente, seu envolvimento na adesão dos linfócitos T.

A reorganização do citoesqueleto de actina das células T também se mostrou dependente dos eventos intracelulares iniciados com a ligação do antígeno ao TCR. Mudanças na reorganização do citoesqueleto durante a ativação das células T é um pré-requisito para uma resposta imune específica, uma vez que são responsáveis por um contato contínuo entre o linfócito T e a APC. Essas mudanças controlam a forma e a polaridade dessas células e, conseqüentemente, sua adesão, motilidade e proliferação (KRAUSE et al., 2000). PAUKER et al. (2011) mostraram o envolvimento da Fyb na formação de complexos moleculares com outras proteínas, como SLP-76, Nck e WASp (Proteína da Síndrome Wiskott-Aldrich), responsáveis pela reorganização do citoesqueleto após estímulo do TCR. Foi visto que uma

mutação na proteína Fyb causou uma redução na sua ligação com a SLP-76 e que o silenciamento do *FYB* por RNA de interferência resultou em alterações na polimerização da actina e, consequentemente, na formação do citoesqueleto.

ZOU et al. (2008) avaliaram o papel da Fyb na resposta autoimune mediada por células T em camundongos susceptíveis a diabetes Fyb-deficientes e observaram um grande aumento na incidência de diabetes, sugerindo um possível envolvimento da Fyb no desenvolvimento da autoimunidade.

Esses processos, nos quais a Fyb mostrou participar, parecem estar envolvidos diretamente com a ativação dos linfócitos T. Uma vez que os linfócitos T participam, juntamente com as células B, da produção de autoanticorpos, uma ativação alterada dessas células pode ser um dos responsáveis pelo desencadeamento de um processo autoimune. Considerando isso, em um estudo anterior, avaliamos a possível associação de 10 TagSNPs (Polimorfismos de Base Única) no gene *FYB* com o desenvolvimento do LES em uma população de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, encontrando a associação de 2 TagSNPs, localizados nas regiões 5'UTR (rs6863066) e 3'UTR (rs358501) (ANEXO A).

Uma vez que TagSNPs representam outros SNPs que se encontram em desequilíbrio de ligação, o presente estudo procurou novas associações entre o desenvolvimento do LES e SNPs representados pelos TagSNPs rs6863066 e rs358501 na mesma população de Ribeirão Preto, São Paulo (ARTIGO 1).

Para confirmarmos a associação do desenvolvimento do LES com os TagSNPs rs6863066 e rs358501 ou uma possível associação com os outros TagSNPs estudados, foi realizado um estudo de replica na população do estado de Pernambuco, Brasil (ARTIGO 2).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as regiões representadas por 2 TagSNPs do gene *FYB*, inclusive a região promotora, previamente associados à susceptibilidade ao desenvolvimento do Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) em uma população de Ribeirão Preto/SP e avaliar a possível associação desses TagSNPs do gene *FYB* com a susceptibilidade ao LES em uma população de Pernambuco/PE.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a frequência dos SNPs representados pelos 2 TagSNPs do gene *FYB* previamente associados à susceptibilidade ao LES em pacientes e controles da população de Ribeirão Preto/SP.
2. Avaliar o grau de associação desses polimorfismos com a susceptibilidade ao LES em pacientes e controles da população de Ribeirão Preto/SP.
3. Avaliar o grau de associação desses polimorfismos com as principais manifestações clínicas do LES em pacientes da população de Ribeirão Preto/SP.
4. Determinar a frequência dos TagSNPs do gene *FYB* previamente estudados na população de Ribeirão Preto/SP em pacientes e controles de Pernambuco.
5. Avaliar o grau de associação desses polimorfismos com a susceptibilidade ao LES em pacientes e controles da população de Pernambuco.
6. Avaliar o grau de associação desses polimorfismos com as principais manifestações clínicas do LES em pacientes da população de Pernambuco.
7. Identificar fatores genéticos de risco ou proteção comuns entre as duas populações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., PILLAI, S. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

APOSTOLIDIS, S.A. et al. The dysregulation of cytokine networks in systemic lupus erythematosus. *J Interferon Cytokine Res*, v.31, n.10, p.769-779, 2011.

ARBUCKLE, M.R. et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, v.349, n.16, p.1526-1533, 2003.

ASSIS, M.R., Baaklini, C.E. Como Diagnosticar e Tratar Lúpus eritematoso sistêmico. *Revista Brasileira de Medicina*, 2009.

BARBER, E.K. et al. The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.86, n.9, p.3277-3281, 1989.

BARRAT, F.J. et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*, v.202, n.8, p.1131-1139, 2005.

BARRETO, M. et al. Evidence for CTLA4 as a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet*, v.12, n.8, p.620-626, 2004.

BENNETT, L. et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med*, v.197, n.6, p.711-723, 2003.

BOERTH, N.J., JUDD, B.A., KORETZKY, G.A. Functional association between SLAP-130 and SLP-76 in Jurkat T cells. *J Biol Chem*, v.275, n.7, p.5143-5152, 2000.

BONELLI, M. et al. Foxp3 expression in CD4⁺ T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic analysis. *Ann. Rheum. Dis.*, v.67, n.5, p.664-671, 2008.

CHAKRAVARTY, E.F. et al. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis Rheum*, n.56, v.6, p. 2092-2094, 2007.

CHAVELE, K.M., EHRENSTEIN, M.R. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett.*, v.585, n.23, p.3603-3610, 2011.

CHU, Z.T. et al. Association of Fcγ receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations. *Tissue Antigens*, v.63, n.1, p.21-27, 2004.

CLEMENTS, J.L. et al. Integration of T cell receptor-dependent signaling pathways by adapter proteins. *Annu Rev Immunol*, v.17, p.89-108, 1999.

CLEMENTS, J.L., et al. Requirement for the leukocyte specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development. *Science*, v.281, n.5375, p.416-419, 1998.

- COHEN-SOLAL, J.F. et al. Hormonal regulation of B-cell function and systemic lupus erythematosus. *Lupus*, v.17, n.6, p.528–532, 2008.
- COJOCARU, M. et al. Manifestations of systemic lupus erythematosus. *Maedica*, v.6, n.4, p.330-3366, 2011.
- COOPER, G.S. et al. Recent advances and opportunities in research on lupus: environmental influences and mechanisms of disease. *Environ Health Perspect.*, v.116, n.6, p.695-702, 2008.
- CRISPÍN, J.C. et al. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol*, v.181, n.12, p.8761–8766, 2008.
- CRISPÍN, J.C. et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med*, v.16, n.2, p.47-57, 2010.
- CUNNINGHAME GRAHAM, D.S. et al. Polymorphism at the TNF superfamily gene TNFSF4 confers susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*, v.40, n.1, p.83–89, 2008.
- DA SILVA, A.J. et al. Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.94, n.14, p.7493–7498, 1997a.
- DA SILVA, A.J. et al. Biochemical analysis of p120/130: a protein tyrosine kinase substrate restricted to T and myeloid cells. *J. Immunol*, v.158, n.5, p.2007–2016, 1997b.
- DANCHENKO, N., SATIA, J.A., ANTHONY, M.S. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus*, v.15, n.5, p.308–318, 2006.
- D'CRUZ, D.P., KHAMASHTA, M.A., HUGHES, G.R. Systemic lupus erythematosus. *Lancet*, v. 369, n.9561, p. 587-596, 2007.
- DELGADO-VEGA, A.M. et al. Recent Findings on Genetics of Systemic Autoimmune Diseases. *Curr Opin Immunol.*, v.22, n.6, p.698-705, 2010.
- DELGADO-VEGA, A.M. et al. Replication of the TNFSF4 (OX40L) promoter region association with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*, v.10, n.3, p.248–253, 2009.
- DEMIRCI, F.Y. et al. Association of a common interferon regulatory factor 5 (IRF5) variant with increased risk of systemic lupus erythematosus (SLE). *Ann Hum Genet*, v.71, p.308–311, 2007.
- DENG, Y., TSAO, B.P. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol.*, v.6, n.12, p.683-692, 2010.
- DOREAU, A. et al. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol*, v.10, n.7, p.778–785, 2009.

- DRABORG, A.H., DUUS, K., HOUEN, G. Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol.*, 2012.
- DUARTE, A.A. Fator antinúcleo na dermatologia. *Anais Brasileiro de Dermatologia*. São Paulo, v.4, n.80, p.387 – 394, 2005.
- DUSTIN, M.L., SPRINGER, T.A. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature*, v.341, n. 6243, p.619–624, 1989.
- ENYEDY, E.J. et al. Defective FcγRIIb1 signaling contributes to enhanced calcium response in B cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*, v.101, n.2, p.130–135, 2001.
- FANCIULLI, M. et al. FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. *Nat Genet.*, v.39, n.6, p.721-723, 2007.
- FAVILLI, F. et al. IL-18 activity in systemic lupus erythematosus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1173, p.301–309, 2009.
- FERNANDEZ-BLANCO, L. et al. A CTLA-4 polymorphism associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, v.50, n.1, p.328-329, 2004.
- GATEVA, V. et al. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*, v.41, n.11, p.1228-33, 2009.
- GHEBREHIWET, B., PEERSCHKE, E. I. Role of C1q and C1q receptors in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Curr Dir Autoimmun*, v.7, p.87–97, 2004.
- GLADMAN, D. 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*, v.39, n.3, p.363-369, 1996.
- GOH, Y.P., NAIDOO P., NGIAN G.S. Imaging of systemic lupus erythematosus. Part II: Gastrointestinal, renal, and musculoskeletal manifestations. *Clin Radiol.*, v.68, n.2, p.192-202, 2012.
- GOLDBERG, M. et al. Histocompatibility antigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, v.19, n.2, p.129–132, 1976.
- GORJESTANI, S. et al. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 signalling in SLE T cells is influenced by oestrogen and disease activity. *Lupus*, v.17, n.6, p.548–554, 2008.
- GRAHAM, R.R. et al. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*, v.38, n.5, p.550–555, 2006.
- GRAHAM, R.R. et al. Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*, v.40, n.9, p.1059–1061, 2008.
- GRAHAM, R.R. et al. Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.104, n.16, p.6758–6763, 2007.

GREGERSEN, P.K., OLSSON, L.M. Recent advances in the genetics of autoimmune disease. *Annu Rev Immunol*, v.27, p.363–391, 2009.

GRIFFITHS, E.K. et al. Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap. *Science*, v.293, n.5538, p.2260–2263, 2001.

HAN, J.W. et al. Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*, v.41, n.11, p.1234–1237, 2009.

HARLEY, J.B. et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet*, v.40, n.2, p.204–210, 2008.

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

HOM, G. et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med*, v.358, n.9, p.900–909, 2008.

HUANG, J.L.; YAO, T.C.; SEE, L.C. Prevalence of pediatric systemic lupus erythematosus and juvenile chronic arthritis in a Chinese population: a nation-wide prospective population-based study in Taiwan. *Clin Exp Rheumatol*, v.22, n.6, p. 776–780, 2004.

HUDSON, L.L. et al. CTLA-4 gene polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a highly significant association with a determinant in the promoter region. *Hum Genet*, v.111, p.452–455, 2002.

HUEMER, C. et al. Incidence of pediatric rheumatic diseases in a regional population in Austria. *J Rheumatol*, v.28, n.9, p.2116–2119, 2001.

ITO, I. et al. Replication of the association between the C8orf13-BLK region and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Rheum.*, v.60, n.2, p.553–558, 2009.

ITO, T. et al. OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.103, n.35, p.13138–13143, 2006.

JACOB, C.O. et al. Identification of IRAK1 as a risk gene with critical role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.106, n.15, p.6256–6261, 2009.

JUANG, Y.T. et al. Systemic lupus erythematosus serum IgG increases CREM binding to the IL-2 promoter and suppresses IL-2 production through CaMKIV. *J Clin Invest*, v.115, n.4, p.996–1005, 2005.

KANG, H. et al. SH3 domain recognition of a proline-independent tyrosine-based RKxxYxxY motif in immune cell adaptor SKAP55. *EMBO J.*, v.19, n.12, p.2889–2899, 2000.

KAWASAKI, A. et al. Association of IRF5 polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: support for a crucial role of intron 1 polymorphisms. *Arthritis Rheum*, v.58, n.3, p.826–834, 2008a.

- KAWASAKI, A. et al. Role of STAT4 polymorphisms in systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study of the STAT1–STAT4 region. *Arthritis Res Ther*, v.10, n.5, p.R113, 2008b.
- KELLY, J.A. et al. Interferon regulatory factor-5 is genetically associated with systemic lupus erythematosus in African Americans. *Genes Immun*, v.9, n.3, p.187–194, 2008.
- KILMON, M.A. et al. Macrophages prevent the differentiation of autoreactive B cells by secreting CD40 ligand and interleukin-6. *Blood*, v.110, n.5, p.1595–1602, 2007.
- KINASHI, T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.*, v.5, n.7, p.546–559, 2005.
- KITCHING, A.R. et al. IL-12p40 and IL-18 in crescentic glomerulonephritis: IL-12p40 is the key Th1-defining cytokine chain, whereas IL-18 promotes local inflammation and leukocyte recruitment. *Journal of the American Society of Nephrology*, v.16, n.7, p. 2023–2033, 2005.
- KORN, T., et al. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev Immunol*, v.27, p.485–517, 2009.
- KOZYREV, S. V. et al. Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*, v.40, n.4, p.484, 2008.
- KRAUSE, M. et al. Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* v. 149, n.1, p.181–94, 2000.
- KYOGOKU, C. et al. Fc γ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. *Arthritis Rheum*, v.46, n.5, p.1242–1254, 2002.
- KYTTARIS, V.C. Systemic Lupus Erythematosus: From Genes to Organ Damage. *Methods Mol Biol*, n.662, p.265–283, 2010.
- LALANI, T.A. et al. Imaging findings in systemic lupus erythematosus. *Radiographics*, v.24, n.4, p.1069–86, 2004.
- LE BON, A. et al. Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN. *J Immunol*, v.176, n.4, p.2074–2078, 2006.
- LEE, H.S., et al. Independent association of HLA-DR and Fc γ receptor polymorphisms in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*, v.42, n.12, p.1501–1507, 2003.
- LEE, H.Y. et al. Altered frequency and migration capacity of CD4+CD25+ regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*, v.47, n.6, p.789–794, 2008.
- LEE, Y.H., HARLEY, J.B., NATH, S.K. CTLA-4 polymorphisms and systemic lupus erythematosus (SLE): a meta-analysis. *Hum Genet.*, v.116, n.5, p. 361–367, 2005.

- LEE-KIRSCH, M.A. et al. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nature Genet*, v.39, n.9, p.1065-1067, 2007.
- LI, Y. et al. Phosphorylated ERM is responsible for increased T cell polarization, adhesion, and migration in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, v.178, n.3, p.1938-1947, 2007.
- LIEBERMAN, L.A., TSOKOS G.C. The IL-2 defect in systemic lupus erythematosus. disease has an expansive effect on host immunity. *J Biomed Biotechnol*, 2010.
- LIT, L.C. et al. Raised plasma concentration and ex vivo production of inflammatory chemokines in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v.65, n.2, p.209–215, 2006.
- LIU, J. et al. FYB (FYN binding protein) serves as a binding partner for lymphoid protein and FYN kinase substrate SKAP55 and a SKAP55-related protein in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.95, n.15, p.8779-84, 1998.
- LIU, M.F. et al. CTLA-4 gene polymorphism in promoter and exon-1 regions in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, v.10, n.9, p.647-649, 2001.
- LÖFGREN, S.E. et al. Promoter insertion/deletion in the IRF5 gene is highly associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in distinct populations, but exerts a modest effect on gene expression in peripheral blood mononuclear cells. *J Rheumatol*, v.37, n.3, p.574–578, 2010.
- LOUIS, P.J., FERNANDES R. Review of systemic lupus erythematosus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.91, n.5, p.512- 6, 2001.
- LUO, B.H., CARMAN, C.V., SPRINGER T.A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.*, v.25, p.619–647, 2007.
- MACKAY, M. et al. Selective dysregulation of the FcγRIIB receptor on memory B cells in SLE. *J Exp Med*, v.203, n.9, p.2157-2164, 2006.
- MAGNUSSON, V. et al. Both risk alleles for FcγRIIA and FcγRIIIA are susceptibility factors for SLE: a unifying hypothesis. *Genes and Immunity*, v.5, n.2, p.130–137, 2004.
- MANDERSON, A.P., BOTTO, M., WALPORT, M.J. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol*, v.22, p.431–456, 2004.
- MANSON, J.J. et al. Relationship between anti-dsDNA, antinucleosome and anti-alpha-actinin antibodies and markers of renal disease in patients with lupus nephritis: a prospective longitudinal study. *Arthritis Res Ther*, v.11, n.5, p.R154, 2009.
- MARIE-CARDINE, A. et al. Molecular interaction between the Fyn-associated protein SKAP55 and the SLP-76-associated phosphoprotein SLAP-130. *J. Biol. Chem.*, v.273, n.40, p.25789–25795, 1998a.
- MARIE-CARDINE, A. et al. SKAP-HOM, a novel adaptor protein homologous to the FYN-associated protein SKAP55. *FEBS Lett*. v. 435, n.1, p.55-60, 1998b.

- MASON J.J., ISENBERG, D.A. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *The Journal of Medicine*, v.61, n.11, p.343-346, 2003.
- MIYARA, M. et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* v.175, n.12, p.8392–8400, 2005.
- MOK, M.Y. et al. Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, v.49, n.3, p.520–527, 2010.
- MUSCI, M. et al. Molecular cloning of SLAP-130, an SLP-76-associated substrate of the T cell antigen receptor-stimulated protein tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*, v.272, n.18, p.11674–11677, 1997.
- NAKASHIMA, C.A.K. et al. Incidence and clinical-laboratory aspects of systemic lupus erythematosus in a Southern Brazilian city. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.51, n.3, p. 231-239, 2011.
- NALBANDIAN A., CRISPÍN J.C., TSOKOS G.C. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. *Clin Exp Immunol*, v.157, n.2, p.209–215, 2009.
- NATH, S.K. et al. A nonsynonymous functional variant in integrin- α -M (encoded by ITGAM) is associated with systemic lupus erythematosus. *Nature Genet*, v.40, n.2, p.152-154, 2008.
- NIEWOLD, T.B. et al. Age- and sex-related patterns of serum interferon- α activity in lupus families. *Arthritis Rheum*, v.58, n.7, p. 2113-2119, 2008.
- NIEWOLD, T.B. et al. High serum INF- α activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*, v.8, n.6, p.492-502, 2007.
- OKAMOTO, H. et al. Interferon-inducible protein 10/CXCL10 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with central nervous system lupus. *Arthritis Rheumatism*, v.50, n.11, p.3731– 3732, 2004.
- OKAMOTO, H. et al. IP-10/MCP-1 ratio in CSF is an useful diagnostic marker of neuropsychiatric lupus patients. *Rheumatology*, v.45, n.2, p.232–234, 2006.
- ORRÚ, V. et al. A loss-of-function variant of PTPN22 is associated with reduced risk of systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet*, v.18, n.3, p.569–579, 2009.
- PALOMINO-MORALES, R.J. et al. STAT4 but not TRAF1/C5 variants influence the risk of developing rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Colombians. *Genes Immun*, v.9, n.4, p.379–382, 2008.
- PASCUAL, V., BANCHEREAU J., PALUCKA A.K. The central role of dendritic cells and interferon- α in SLE. *Curr Opin Rheumatol*, v.15, n.5, p.548-556, 2003.
- PATHAK, S., MOHAN C. Cellular and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther.*, v.13, n.5, p.241, 2011.
- PAUKER, M.H. et al. Functional cooperation between the proteins Nck and ADAP is fundamental for actin reorganization. *Mol Cell Biol.*, v.31, n.13, p.2653-2666, 2011.

- PIVNIOUK, V. et al, Impaired viability and profound block in thymocyte development in mice lacking the adaptor protein SLP-76. *Cell*, v.94, n.2, p.229–238, 1998.
- PONS-ESTEL, G.J. et al. Understanding the Epidemiology and Progression of Systemic Lupus Erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*, v.39, n.4, p.257, 2010.
- RAAB, M. et al. FYN-T-FYB-SLP-76 interactions define a T-cell receptor ζ /CD3-mediated tyrosine phosphorylation pathway that upregulates interleukin 2 transcription in T-cells. *J. Biol. Chem.*, v.274, n.30, p.21170–21179, 1999.
- RAHMAN, A., ISENBERG, D.A. Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med*, v.358, n.9, p.929–939, 2008
- REMMERS, E.F. et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, v.357, n.10, p.977–986, 2007.
- RIECK, M. et al. Genetic variation in PTPN22 corresponds to altered function of T and B lymphocytes. *J. Immunol.*, v.179, n.7, p.4704–4710, 2007.
- ROBINSON, M., COOK, S.S., CURRIE, L.M. Systemic lupus erythematosus: A genetic review for advanced practice nurses. *J Am Acad Nurse Pract.*, v.23, n.12, p.629–627, 2011.
- RONNBLOM, L., ALM, G.V., ELORANTA, M.L. Type I interferon and lupus. *Current Opin Rheumatol*, v.21, n.5, p.471–477, 2009.
- RUDD, C.E. Adaptors and molecular scaffolds in immune cell signaling, v.96, n.1, p.5–8, 1999.
- RUIZ-IRASTORZA, G. et al. Antiphospholipid syndrome. *Lancet*, v.376, n.9751, p.1498–1509, 2010.
- RUSSELL, A.I. et al. Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus. *Hum Molec Genet*, v.13, n.1, p.137–147, 2004.
- SAMELSON, L.E. Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins. *Annu. Rev. Immunol.*, v.20, p.371–394, 2002.
- SÁNCHEZ, E. et al. Identification of a new putative functional IL18 gene variant through an association study in systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet*, v.18, n.19, p.3739–3748, 2009.
- SANDRIN-GARCIA, P. et al. Shared and unique gene expression in systemic lupus erythematosus depending on disease activity. *Ann N Y Acad Sci*, v.1173, p.493–500, 2009.
- SASIDHARAN, P.K., BINDYA, M., SAJEETH K.K.G. Hematological Manifestations of SLE at Initial Presentation: Is It Underestimated? *ISRN Hematol.*, 2012.
- SATO, E.I. et al. Lúpus eritematoso sistêmico: acometimento cutâneo/articular. *Rev Assoc Med Bras*, v.52, n.6, p. 375–388, 2006.

SCHIFFER, L. et al. B-cellattracting chemokine CXCL13 as a marker of disease activity and renal involvement in systemic lupus erythematosus (SLE). *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.24, n.12, p.3708-3712, 2009.

SCHWARTZBERG, P.L., FINKELSTEIN, L.D., READINGER, J.A. TEC-family kinases: regulators of Thelper-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.*, v.5, n.4, p.284–295, 2005.

SHERER, Y. et al. Autoantibody Explosion in Systemic Lupus Erythematosus: More than 100 Different Antibodies Found in SLE Patients. *Semin Arthritis Rheum*, v.34, n.2, p.501-537, 2004.

SHIN, H. D. et al. Replication of the genetic effects of IFN regulatory factor 5 (IRF5) on systemic lupus erythematosus in a Korean population. *Arthritis Res Ther*, v.9, n.2, p.R32, 2007.

SHIN, H.D. et al. Common DNase I polymorphism associated with autoantibody production among systemic lupus erythematosus patients. *Hum Molec Genet*, v.13, n.20, p. 2343-2350, 2004.

SIGGS, O.M. et al. Opposing functions of the T cell receptor kinase ZAP-70 in immunity and tolerance differentially titrate in response to nucleotide substitutions. *Immunity*, v.27, n.6, p.912–926, 2007.

SIGURDSSON, S. et al. Comprehensive evaluation of the genetic variants of interferon regulatory factor 5 (IRF5) reveals a novel 5 bp length polymorphism as strong risk factor for systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet*, v.17,n.6, p.872–881, 2008a.

SIGURDSSON, S. et al. A risk haplotype of STAT4 for systemic lupus erythematosus is overexpressed, correlates with anti-dsDNA and shows additive effects with two risk alleles of IRF5. *Hum Mol Genet*, v.17, n.18, p2868–2876, 2008b.

SIRIBOONRIT, U. et al. Association of Fcγ receptor IIb and IIIb polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens*, v.61, n.5, p.374–383, 2003.

SIU, H.O. et al. Association of a haplotype of IRF5 gene with systemic lupus erythematosus in Chinese. *J Rheumatol.*, v.35, n.2, p.360–362, 2008.

SMITH-BOUVIER, D.L. et al. A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. *J. Exp.Med.*, v.205, n.5, p.1099–1108, 2008.

STETSON, D.B. et al. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell*, v.134, n.4, p.587–598, 2008.

TAHA KHALAF, A. et al. CTLA-4 gene polymorphism and the risk of systemic lupus erythematosus in the Chinese population. *J Biomed Biotechnol*, 2011.

TAN, E.M. et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, v.25, n.11, p.1271-1277, 1982.

TAYLOR, K.E. et al. Specificity of the STAT4 genetic association for severe disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet.*, v.4, n.5, 2008.

- TEFT, W.A., KIRCHHOF, M.G., MADRENAS, J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol*, v.24, p.65-97, 2006.
- TOBÓN, G.J. et al. Are autoimmune diseases predictable? *Autoimmun Rev.*, n.4, v.11, p.259-266, 2012.
- TOGNI, M. et al: The role of adaptor proteins in lymphocyte activation. *Mol Immunol.*, v.41, p.615–630, 2004.
- TSAO, B.P. The genetics of human systemic lupus erythematosus. *Trends Immunol*, v.24, n.11, p.595-602, 2003.
- ULKER, M. et al. CTLA-4 gene polymorphism of exon 1(+49 A/G) in Turkish systemic lupus erythematosus patients. *Int J Immunogenet*, v.36, n.4, p.245-50, 2009 .
- UVA, L et al. Cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis.*, 2012.
- VALENCIA, X. et al. Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* v.178, n.4, p.2579–2588, 2007.
- VANG, T. et al. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat. Genet.*, v.37, n.12, p.1317–1319, 2005.
- VARGAS, K.S., ROMANO, M.A. Lúpus Eritematoso Sistêmico: aspectos epidemiológicos e diagnóstico. *Revista Salus-Guarapuava*, v.1, n.3, p.15 – 22, 2009.
- VEALE, M. et al. Novel isoform of lymphoid adaptor FYN-T-binding protein (FYB-130) interacts with SLP-76 and up-regulates interleukin 2 production. *J Biol Chem.*, v.274, n.40, p.28427-28435, 1999.
- VILAR, M.J.P., SATO, E.I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus*, n.8, v.11, p.528-532, 2002.
- WANG H., RUDD, C.E. SKAP-55, SKAP-55-related and ADAP adaptors modulate integrin-mediated immune-cell adhesion. *Trends Cell Biol.*, v.18, n.10, p.486-493, 2008.
- WEISS, A., LITTMAN, D.R. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*, v.76, n.2, p.263–274, 1994.
- WILLCOCKS, L.C. et al. Copy number of FCGR3B, which is associated with systemic lupus erythematosus, correlates with protein expression and immune complex uptake. *J Exp Med*, v.205, n.7, p.1573–1582, 2008.
- WONG, C.K et al. Activation profile of intracellular mitogen-activated protein kinases in peripheral lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Immunology*, v.29, n.6, p.738–746, 2009.
- WONG, C.K et al. Elevated production of B Cell Chemokine CXCL13 is correlated with systemic lupus erythematosus disease activity. *Journal of Clinical Immunology*, v.30, n.1, p.45–52, 2010.

- WU, J.N. et al. Adhesion- and degranulation-promoting adapter protein is required for efficient thymocyte development and selection. *J Immunol.*, v.176, n.11, p.6681-6689, 2006.
- YANG, W. et al. Genome-wide association study in Asian populations identifies variants in *ET*, *S1* and *WDFY4* associated with systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet*, v.6, n.2, 2010.
- YANG, Z. et al. Association of increased serum IL-33 levels with clinical and laboratory characteristics of systemic lupus erythematosus in Chinese population. *Clinical and Experimental Medicine*, v.11, n.2, p.75–80, 2011.
- YODER, J. et al. Requirement for the SLP-76 adaptor GADS in T cell development. *Science*, v.291, n.5510, p.1987–1991, 2001.
- YOKOYAMA, K. et al. BANK regulates BCR-induced calcium mobilization by promoting tyrosine phosphorylation of IP(3) receptor. *EMBO J*, v.21, p.83–92, 2002.
- YU, S.L. et al. Immunopathological Roles of cytokines, Chemokines, SignalingMolecules, and Pattern-Recognition Receptors in Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Dev Immunol*, 2012.
- YURASOV, S. et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*, v.201, n.5, p.703–711, 2005.
- YURASOV, S. et al. Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *J Exp Med*, v.203, n.10, p. 2255-2261, 2006.
- ZHANG, W. et al. Essential role of LAT in T cell development. *Immunity*, v.10, n.3, p. 323–332, 1999.
- ZHANG, Z. et al. The association of the BLK gene with SLE was replicated in Chinese Han. *Arch Dermatol Res*, v.302, n.8, p.619–624, 2010.
- ZOU, L. et al. Defective positive selection results in T cell lymphopenia and increased autoimmune diabetes in ADAP-deficient BDC2.5-C57BL/6 mice. *Eur J Immunol.*, v.38, n.4, p.986-994, 2008.

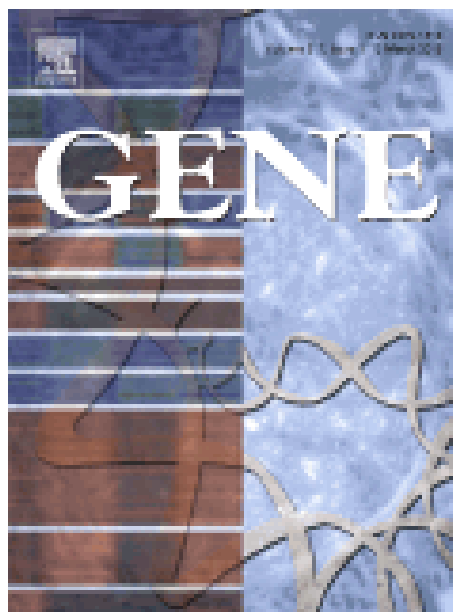
ARTIGO 1**Título**

NEW POLYMORPHISM IN *FYB* (FYN BINDING PROTEIN) GENE PROMOTER
REGION ASSOCIATED TO SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Autores

Catarina Addobbati, João Alexandre Três Pancotto, Eduardo Antônio Donadi, Ludovica Segat, Sergio Crovella, Paula Sandrin-Garcia.

A ser submetido à Revista Gene (Fator de impacto: 2.341)



NEW POLYMORPHISM IN *FYB* (FYN BINDING PROTEIN) GENE PROMOTER REGION ASSOCIATED TO SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Catarina Addobbati^{a,e}, João Alexandre Trés Pancotto^b, Eduardo Antônio Donadi^c, Ludovica Segat^d, Sergio Crovella^{a,e}, Paula Sandrin-Garcia^{a,e}.

Affiliation

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

^b Federal University of Espírito Santo, UFES, São Mateus, Espírito Santo, Brazil.

^c Division of Clinical Immunology, Department of Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP Brazil.

^d Institute for Maternal and Child Health - IRCCS “Burlo Garofolo” – Trieste, Italy.

^e Department 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 an autoimmune disease that can affect multiples organs and display a complex spectrum of clinical manifestations. Susceptibility to SLE is associated to immunological and genetic factors and several genes have been associated to disease. *FYB* (Fyn Binding Protein) gene encodes an adaptor protein participating in T cell activation. Since T cells is implicated in the autoimmune process, *FYB* gene was considered to be involved in SLE susceptibility. In a previous study we found an association between the TagSNPs rs6863066 (5'UTR) and rs358501 (3'UTR) of *FYB* gene and SLE susceptibility in a Southeastern Brazilian population. The aim of this study was to evaluate the possible association between SNPs in linkage disequilibrium with this TagSNPs. Thus, we sequenced the promoter region, part of 5'UTR and 3'UTR of *FYB* gene in the same study group, 143 SLE patients and 184 controls. The previous association of rs6863066 and rs358501 SNPs with SLE susceptibility was confirmed in our sequencing results and significant differences were observed for rs13188259 G>A SNP located at promoter region of *FYB* gene. The A allele and A/A and G/A genotypes presence conferred an increased risk for SLE development (OR = 1.77, OR = 2.6 and OR = 2.2, respectively). When considering SLE manifestations, we did not found any association between the newly studied SNPs and its occurrence, but the association of the previously studied rs2161612 SNP, located at 3'UTR of *FYB* gene, with hematological alterations in SLE patients was confirmed. Our results indicate *FYB* gene polymorphisms as possible risk factors for SLE development and its related laboratorial manifestations.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus, SNP, *FYB*, Autoimmunity

1 Introduction

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a complex and chronic autoimmune disease with multiple organs affected. The diverse clinical and laboratorial manifestations of the disorder are caused mostly by autoantibodies against nuclear and cytoplasmic antigens and deposition of immune complexes in the tissue leading to inflammation in skin, kidneys, brain and blood vessels (Kyttaris, 2010). The etiology of SLE has not been completely understood, but it is well known that genetic, environmental and immunological factors contribute to the pathogenesis of disease (Crispin et al., 2010). The genetics contribution in the SLE etiology is strongly established and many genes with relevant immune function have been studied as candidates (Vyse and Kotzin, 1998; Criswell, 2008). In a previous study we found an association between two TagSNPs (Single Nucleotide Polymorphism) located at 5'UTR and 3'UTR (rs6863066 and rs358501, respectively) of *FYB* gene and SLE susceptibility (Personal Communication).

The *FYB* gene is located at chromosome 5 (5p13.1) and encodes an adaptor protein involved in the T cell signal transduction pathway (Griffiths et al., 2001). The adaptor proteins play a critical role in mediating protein-protein interactions in signal transduction cascade initiated by the engagement of antigen to the lymphocyte surface receptors (Togni et al., 2004). The Fyb protein (Fyn binding protein), also designated SLAP-130 (SLP-76-Associated Phosphoprotein of 130 KDa) or ADAP (Adhesion and Degranulation Promoting Adaptor Protein), was reported in different studies as being involved in the regulation of T cell activation (Griffiths et al., 2001; Wang et al., 2008), integrin-mediated adhesion (Wang and Rudd, 2008), IL-2 (Interleukin 2) production (da Silva et al., 1997; Veale et al., 1999) and thymocytes selection (Wu et al., 2006). SLE is characterized by impaired IL-2 production (Lieberman and Tsokos, 2010; Apostolidis et al., 2011) and dysfunction in T cell regulation

(Crispín et al., 2010), what makes *FYB* gene be a strong candidate to be involved in disease development.

Since a TagSNP represents other SNPs that are in linkage disequilibrium, the aim of this study was to evaluate SNPs neighbors regions covered by the previously associated TagSNPs (rs6863066 and rs358501) with susceptibility to SLE and its manifestations. Thus, we sequenced the promoter region, part of 5'UTR and 3'UTR of *FYB* gene in a Southeastern Brazilian population.

2 Material and methods

2.1 DNA sampling and clinical characterization

Genomic DNA samples of 143 patients (135 females and 8 males) with median age of 39.8 ($\pm$ 11.9) and followed up at the Division of Clinical Immunology, School of Medicine at the Hospital of Ribeirão Preto (University of São Paulo, Brazil). SLE diagnosis has been made according to the criteria defined by the American College of Rheumatology Classification Criteria. The ethnic classification as European- or African-derived was determined according to individual phenotypic characteristics and ethnicity data of parents/grandparents following the skin color-based classification criteria adopted in Brazil (Vargas et al., 2006; Veit et al., 2009). In total, 113 individuals were classified as European-derived (79%) and 30 were classified as African-derived (21%). The collected clinical and laboratorial data regarding the SLE patients is showed in Supplementary data 1.

DNA samples from 184 healthy controls (94 females, 90 males; mean age = 37.0 ± 11.3), from the same geographic area of SLE patients, without previous family history of autoimmune disorders were also obtained. All the controls were blood donors and have been

previously genotyped for HLA haplotypes HLA-A, B, C, DR and DQ. The presence of any HLA risk haplotype to SLE was an exclusion criterion. In the controls group, 136 (74%) were European-derived and 48 African-derived (26%). Written informed consent was obtained from all individuals and the local Ethics Committee approved the protocol of this study (#2234/2007).

2.2 *FYB*'s regions sequencing

The DNA samples were amplified by conventional PCR using specific primers and then submitted to direct sequencing using the BigDye Terminator chemistry in ABI3130 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) following the manufacturer's instructions. The primers and PCR conditions used in the reactions are available upon request.

We sequenced part of the regions covered by the Tag-SNPs rs6863066 (promoter region and part of 5'UTR) and rs358501 (3'UTR) according to SNPBrowserTM Software version 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Figure 1). The sequences obtained were analyzed using the CodonCode Aligner Software (www.codoncode.com/aligner/download.htm).

2.3 Statistical Analysis

Allele and genotype frequencies in patients/controls and Hardy-Weinberg Equilibrium were calculated by Genotype Transposer. The distribution of genotypes according to patient's clinical and laboratorial features were obtained using the EpiInfo version 3.5.1 software (www.cdc.gov/epiinfo/about.htm). Fisher's test was used to test allele and genotype associations with SLE susceptibility and clinical/laboratorial manifestations. The odds ratio (ORs) and 95% confidence intervals (95% CI) were evaluated using the R 2.10.0 (www.r-

project.org/) software. Haplotype data were obtained using Haploview Software (www.hapmap.org/haploview).

3 Results

A total of 41 SNPs were analyzed: 12 SNPs in the promoter region, 3 SNPs in 5'UTR and 26 SNPs in 3'UTR of *FYB*. Twenty nine SNPs were monomorphic in the studied population (Supplementary data 2).

Genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium for all polymorphic SNP in both patients and controls groups ($p > 0.05$). The allele and genotype frequencies of the 12 polymorphic SNPs are listed on Supplementary data 3.

The previous association of rs6863066 and rs358501 SNPs to SLE susceptibility was confirmed in our sequencing results (OR = 2.35; CI = 1.64 – 3.37, $p = 0.000001$ and OR = 1.69; CI = 1.13 – 2.54, $p = 0.008$, respectively).

Moreover, we found a newly established association between the disease development and the SNP rs13188259 G>A located at the promoter region of the *FYB* gene. The A allele was more frequent in patients (38.8%) than in controls (26.4%) ($p = 0.001$) and its presence conferred an increased risk for SLE development (OR = 1.77, CI = 1.27 – 2.47). Both A/A and G/A genotypes were also significantly different between patients and controls (OR = 2.6, CI = 1.19 - 5.64, $p = 0.003$; OR = 2.2, CI = 1.37 - 3.52, $p = 0.001$, respectively), confirming the involvement of A allele in disease susceptibility (Table 1).

To better elucidate the effect of the A allele on SLE development, we compared the genotypes frequencies between SLE patients and controls using the dominant and recessive genetic models (Table 2). The results showed that the effect of the A allele was consistent

with a dominant genetic model (G/A + A/A vs G/G) (OR = 2.26, CI = 1.44 – 3.55, $p = 0.0003$). We did not find association between the A allele and SLE in the recessive model (A/A vs G/A + G/G) ($p = 0.13$).

After stratification for ethnicity, the A allele (rs13188259) was significantly more frequent in European-derived patients when compared to European-derived controls (36.7% vs 23.3%, $p = 0.002$), conferring increased susceptibility to SLE development in this ethnic group (OR = 1.8, CI = 1.23 - 2.67). Both G/A and A/A genotypes frequencies were significantly higher in European-derived patients (55.8% and 8.8%, respectively) than in European-derived controls (33.8% and 7.4%, respectively) ($p = 0.0002$ and $p = 0.007$; OR = 2.7 and OR = 2.0, respectively). When comparing alleles and genotypes frequencies observed in African derived-group, only the homozygous A/A genotype showed to be associated to SLE (OR = 4.2, CI = 1.02 - 17.32, $p = 0.03$). The allele and genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium for this SNP with the exception of the European-derived patients group ($p = 0.03$) (Table 3).

Analyzes of the combined SNPs rs13188259 G>A (promoter region), rs6863066 G>A (5'UTR) and rs358501 A>G (3'UTR) demonstrated that rs13188259 and rs6863066 polymorphisms are in strong linkage disequilibrium in *FYB* gene ($D' = 0.92$) (Figure 2). When we compared haplotypes frequencies of patients and controls for these three SNPs (rs358501-rs6863066-rs13188259), we observed an association of A-A-A, G-G-G and G-A-A haplotypes with SLE susceptibility (OR = 2.35, CI = 1.54 - 3.6, $p = 0.00003$; OR = 1.88, CI = 1.09 – 3.25, $p = 0.02$; OR = 2.37, CI = 1.22 – 4.67, $p = 0.006$, respectively) (Table 4).

After haplotypes stratification according to ethnicity, we also observed an association of A-A-A and G-G-G haplotypes with SLE development in European-derived group (OR =

2.35, CI = 1.5 - 3.6, $p = 0.000003$; OR = 2.47, CI = 1.33 – 4.63, $p = 0.003$). However the same result was not found in African-derived group, since any haplotype did not show to be associated to disease onset in this ethnic group (Table 4).

When we analyzed the possible association between *FYB* gene SNPs and SLE patient's clinical and laboratorial manifestations, we did not find any association between the new studied SNPs and the onset of SLE manifestations. However, the association found in our previous study of the C allele and C/C genotype for rs2161612 T>C SNP (3'UTR) with hematological alterations was confirmed (OR = 0.52, CI = 0.31 - 0.88, $p = 0.01$; OR = 0.14, CI = 0.03 – 0.73, $p = 0.008$, respectively).

4 Discussion

In this study, we investigated the possible association between SNPs in linkage disequilibrium with the previous associated TagSNPs rs6863066 and rs358501, located at 5'UTR and 3'UTR of *FYB* gene, respectively. According to SNPBrowser software, the region covered by the rs6863066 SNP ranges from the promoter region to part of intron 2, while the rs358501 SNP covers from exon 17 to 20 of the studied gene. We choose for sequencing from the promoter region to the rs6863066 SNP in the beginning of 5'UTR and the exon 20, which is the 3'UTR of *FYB* gene.

We confirmed the rs6863066 and rs358501 TagSNPs association to SLE susceptibility and found a new association between the rs13188259 G>A SNP, located at the promoter region of *FYB* gene, and disease development. The A allele and A/A and G/A genotypes of rs13188259 SNP conferred an increased risk for SLE development (OR = 1.77, OR = 2.6 and OR = 2.2, respectively). When analyzing the genotype frequencies in a recessive and dominant genetic models, we found association between the A allele and SLE only in the

dominant model, reinforcing that the A allele is able to confer an increased risk for SLE development when presented in both homozygous and heterozygous genotypes.

After stratification for ethnicity, the rs13188259 A allele was associated for SLE susceptibility only in the European-derived group, conferring an increased risk in this ethnic group (OR = 1.8). Both A/A and G/A genotypes were also associated to SLE development in European-derived group, conferring twice more risk to the disease development in individuals carrying these genotypes (OR = 2.0 and OR = 2.7, respectively). However, since the genotype frequencies of the patients group of this ethnicity were not in Hardy-Weinberg Equilibrium, these results should be carefully analyzed to avoid spurious associations. In the African derived-group, we just observed association between the homozygous A/A genotype and SLE, which could have been caused by reduction of the sample size after stratification for ethnicity.

Our results are supported by the expression assays made by Sandrin-Garcia et al. (2009), which observed a downregulated expression of *FYB* gene in active and inactive SLE patients, suggesting that alterations in the promoter region, such as rs13188259 SNP, and in the untranslated regions of *FYB*, such as rs6863066 and rs358501 SNPs, could be involved on changes in the protein synthesis or stability and then SLE development.

In our previous study, we verified *in silico* the hypothesis of an involvement of the rs6863066 and rs358501 SNPs as target of miRNA, using the PolymiRTS Database 2.0 (<http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/>) and miR-abela (http://www.mirz.unibas.ch/cgi/pred_miRNA_genes.cgi), but none of them was a target for miRNA. We also verified if the rs6863066 and rs13188259 SNPs, located at promoter region and 5'UTR of the gene, respectively, could affect the binding of any transcription factor.

According to the TF-SEARCH program (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), the rs13188259 SNP does not affect the binding of the deltaE transcription factor. However, in presence of the rs6863066 C allele, there is a binding site for the MZF1 factor that is not present when the C allele is replaced by the T allele. If this SNP interferes with the binding of this transcription factor *in vivo*, remains to be further elucidated.

It is well known that potential autoreactive T lymphocytes are excluded from the immune system through autotolerance process, which consists of eliminating the lymphocyte by apoptosis or anergy if the cell displays inappropriately strong signals after TCR interactions with antigens (Abbas et al., 2008). Since the Fyb protein is involved on T cell activation (Togni et al., 2004; da Silva et al., 1997), a reduced concentration of this protein could lead to a deficient activation of a T lymphocyte and, in consequence, an autoreactive cell not be eliminated from the immune system, allowing its participation in autoantibodies release.

Since Fyb adaptor protein showed to be involved in IL-2 up-regulation (Wu et al., 2006) and SLE is characterized by a deficiency in this cytokine concentration, which contributes to a reduction of T regulatory lymphocytes (Apostolidis et al., 2011), cell implicated to autotolerance process (Chavele and Ehrenstein, 2011), we can also hypothesize that a reduction in Fyb protein could also collaborate to the autoreactive cells existence and then to SLE development.

However, the role of Fyb protein in the cascade of T cells activation and IL-2 production is still being elucidated and the effect of the associated SNP on its function remains to be studied experimentally. Moreover, since the rs6863066 and rs13188259 SNP

showed to be in strong linkage disequilibrium ($D'=0.92$), it is necessary to investigate functionally which SNP could have a real consequence in Fyb production.

5 Conclusion

Our results showed an association between a SNP located at the promoter region of *FYB* gene and SLE susceptibility, which may be involved on previous finding of differential *FYB* expression analysis in SLE patients. We also confirmed the association of 2 SNPs located at 5'UTR and 3'UTR with SLE development. However, the functional effect *in vivo* of the associated SNPs is still unknown and replica studies in other populations are necessary to confirm the involvement of *FYB* gene in SLE susceptibility

REFERENCES

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2008. Cellular and Molecular Immunology, Philadelphia: Elsevier, 6th edition.
- Apostolidis, S.A., Lieberman, L.A., Kis-Toth, K., Crispín, J.C., Tsokos, G.C., 2011. The dysregulation of cytokine networks in systemic lupus erythematosus. J Interferon Cytokine Res. 31 (10), 769-79.
- Chavele, K.M. and Ehrenstein, M.R., 2011. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. FEBS Lett. 585 (23), 3603-10.
- Crispín, J.C., Liossis, S.N., Kis-Toth, K., Lieberman, L.A., Kyttaris, V.C., Juang, Y.T., Tsokos, G.C., 2010. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. Trends Mol Med 16 (2), 47-57.
- Criswell, L.A., 2008. The genetic contribution to systemic lupus erythematosus. Bull NYU Hosp Jt Dis. 66 (3), 176–83.
- da Silva, A.J., Li, Z., de Vera, C., Canto, E., Findell, P., Rudd, C.E., 1997. Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. Proc Natl Acad Sci U S A. 94 (14), 7493-8.
- Griffiths, E.K., Krawczyk, C., Kong, Y.Y., Raab, M., Hyduk, S.J., Bouchard, D., Chan, V.S., Kozieradzki, I., Oliveira-Dos-Santos, A.J., Wakeham, A., Ohashi, P.S., Cybulsky, M.I., Rudd, C.E., Penninger, J.M., 2001. Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap. Science 293 (5538), 2260-3.
- Kyttaris, V.C., 2010. Systemic lupus erythematosus: from genes to organ damage. Methods Mol Biol 662, 265-83.
- Lieberman, L.A. and Tsokos G.C., 2010. The IL-2 defect in systemic lupus erythematosus. disease has an expansive effect on host immunity. J Biomed Biotechnol.

Sandrin-Garcia, P., Junta, C.M., Fachin, A.L., Mello, S.S., Baião, A.M., Rassi, D.M., Ferreira, M.C., Trevisan, G.L., Sakamoto-Hojo, E.T., Louzada-Júnior, P., Passos, G.A., Donadi, E.A., 2009. Shared and unique gene expression in systemic lupus erythematosus depending on disease activity. *Ann N Y Acad Sci.* 1173, 493-500.

Togni, M., Lindquist, J., Gerber, A., Kölsch, U., Hamm-Baarke, A., Kliche, S., Schraven, B., 2004. The role of adaptor proteins in lymphocyte activation. *Mol Immunol.* 41 (6-7), 615–630.

Vargas, A.E., Marrero, A.R., Salzano, F.M., Bortolini, M.C., Chies, J.A., 2006. Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res.* 39 (3), 321-5.

Veale, M., Raab, M., Li, Z., da Silva, A.J., Kraeft, S.K., Weremowicz, S., Morton, C.C., Rudd, C.E., 1999. Novel Isoform of Lymphoid Adaptor FYN-T-binding Protein (FYB-130) Interacts with SLP-76 and Up-regulates Interleukin 2 Production. *J Biol Chem* 274 (40), 28427-35.

Veit, T.D., Cordero, E.A., Mucenic, T., Monticelo, O.A., Brenol, J.C., Xavier, R.M., Delgado-Cañedo, A., Chies, J.A., 2009. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 18(5), 424-30.

Vyse, T.J. and Kotzin, B.L., 1998. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol.* 16, 261-92.

Wang, H. and Rudd, C.E., 2008. SKAP-55, SKAP-55-related and ADAP adaptors modulate integrin-mediated immune-cell adhesion. *Trends Cell Biol.* 18(10), 486-93.

Wu, J.N., Gheith, S., Bezman, N.A., Liu, Q.H, Fostel, L.V., Swanson, A.M., Freedman, B.D., Koretzky, G.A., Peterson, E.J., 2006. Adhesion- and Degranulation-promoting adapter protein is required for efficient thymocyte development and selection. *J. Immunol.* 176 (11), 6681-6689.

TABLES

Table 1. Allele and genotype frequencies of *FYB* rs13188259 SNP in SLE patients and healthy controls.

<i>FYB</i> SNP	Patients n=143 n (%)	Controls n=184 n (%)	OR, CI and <i>p</i>
rs13188259			
Alleles			
G	175 (61.2)	271 (73.6)	OR = 1
A	111 (38.8)	97 (26.4)	OR = 1.77, CI = 1.27 - 2.47, <i>p</i> = 0.001^a
Genotypes			
G/G	50 (34.9)	101 (54.9)	OR = 1
G/A	75 (52.5)	69 (37.5)	OR = 2.2, CI = 1.37 - 3.52, <i>p</i> = 0.001^a
A/A	18 (12.6)	14 (7.6)	OR = 2.6, CI = 1.19 - 5.64, <i>p</i> = 0.003^a
	HWE <i>p</i> = 0.21	HWE <i>p</i> = 0.64	
OR = Odds Ratio, CI = 95% Confidence Interval, HWE = Hardy-Weinberg Equilibrium,			
^a Statistically significant <i>p</i> -value.			

Table 2. Analyzes of rs13188259 SNP in a recessive and dominant genetic model.

	Patients n=143 n (%)	Controls n=184 n (%)	OR, CI and <i>p</i>
Dominant genetic model			
rs13188259			
Genotypes			
G/G	50 (35)	101 (54.9)	OR = 1
G/A + A/A	93 (65)	83 (45.1)	OR = 2.26, CI = 1.44 – 3.55, <i>p</i> = 0.0003^a
Recessive genetic model			
rs13188259			
Genotypes			
G/A + G/G	125 (87)	170 (92.4)	OR = 1
A/A	18 (13)	14 (7.6)	OR = 1.75, CI = 0.85 – 3.7, <i>p</i> = 0.13
OR = Odds Ratio, CI = 95% Confidence Interval, HWE (Hardy-Weinberg Equilibrium),			
^a Statistically significant p-value.			

Table 3. Allele and genotype frequencies of *FYB* rs13188259 SNP in SLE patients and healthy controls after stratification for ethnicity.

EUROPEAN-DERIVED GROUP			
	Patients n=113 n (%)	Controls n=136 n (%)	OR, CI and <i>p</i>
rs13188259			
Alleles			
G	143 (63.3)	206 (75.7)	OR=1
A	83 (36.7)	66 (23.3)	OR=1.8, CI = 1.23 - 2.67, <i>p</i> = 0.002^a
Genotypes			
G/G	40 (35.4)	80 (58.8)	OR = 1
G/A	63 (55.8)	46 (33.8)	OR = 2.7, CI = 1.6 - 4.69, <i>p</i> = 0.0002^a
A/A	10 (8.8)	10 (7.4)	OR = 2.0, CI = 0.77 – 5.2, <i>p</i> = 0.007^a
	HWE <i>p</i> = 0.03	HWE <i>p</i> = 0.35	
AFRICAN-DERIVED GROUP			
	Patients n=30 n (%)	Controls n=48 n (%)	OR, CI and <i>p</i>
rs13188259			
Alleles			
G	32 (53.3)	65 (67.7)	OR = 1
A	28 (46.7)	31 (32.3)	OR = 1.8, CI = 0.94-3.56, <i>p</i> = 0.07
Genotypes			
G/G	10 (33.3)	21 (43.8)	OR = 1
G/A	12 (40)	23 (47.9)	OR = 1.1, CI = 0.39 - 3.06, <i>p</i> = 0.38
A/A	8 (26.7)	4 (8.3)	OR = 4.2, CI = 1.02- 17.32, <i>p</i> = 0.03^a
	HWE <i>p</i> = 0.28	HWE <i>p</i> = 0.51	
OR = Odds Ratio, CI = 95% Confidence Interval, HWE (Hardy-Weinberg Equilibrium), ^a Statistically significant <i>p</i> -value.			

Table 4. Haplotypes frequencies of *FYB* rs358501, rs6863066 and rs13188259 SNPs in SLE patients and healthy controls stratified or not for ethnicity.

Haplotypes rs358501- rs6863066- rs13188259	Patients		Controls		OR, CI and <i>p</i>
	N	(%)	N	(%)	
A - G - G	129	45.2	236	64.2	OR = 1
A - A - A	76	26.5	59	16	OR = 2.35, CI = 1.54 – 3.6, <i>p</i> = 0.00003^a
G - G - G	36	12.4	35	9.5	OR = 1.88, CI = 1.09 – 3.25, <i>p</i> = 0.02^a
G - A - A	26	9.1	20	5.4	OR = 2.37, CI = 1.22 – 4.67, <i>p</i> = 0.006^a
A - G - A	7	2.6	13	3.5	OR = 0.98, CI = 0.32 – 2.74, <i>p</i> = 1
G - A - G	7	2.7	ND	ND	ND
G - G - A	2	0.7	5	1.4	OR = 0.73, CI = 0.07 – 4.55, <i>p</i> = 1
A - A - G	3	0.9	ND	ND	ND
European-derived group					
A - G - G	101	44,5	182	67	OR = 1
A - A - A	66	29,1	40	14,5	OR = 2.35, CI = 1.5 – 3.6, <i>p</i> = 0.000003^a
G - G - G	33	14,7	24	8,8	OR = 2.47, CI = 1.33 – 4.63, <i>p</i> = 0.003^a
G - A - A	11	4,8	14	5,3	OR = 1.41, CI = 0.56 – 3.50, <i>p</i> = 0.52
A - G - A	5	2,3	8	3,1	OR = 1.13, CI = 0.28 – 4.02, <i>p</i> = 1
G - A - G	7	3,1	ND	ND	ND
G - G - A	1	0,5	4	1,3	OR = 0.45, CI = 0.01 – 4.64, <i>p</i> = 0.66
A - A - G	2	1,03	ND	ND	ND
African-derived group					
A - G - G	25	41.1	56	56.8	OR = 1
A - A - A	15	24.2	18	18.2	OR = 1.86, CI = 0.74 – 4.63, <i>p</i> = 0.19
G - G - G	10	17.3	8	7.8	OR = 2.76, CI = 0.87 – 9.15, <i>p</i> = 0.06
G - A - A	6	10.5	11	10.9	OR = 1.22, CI = 0.33 – 4.1, <i>p</i> = 0.77
A - G - A	2	3	7	6.3	OR = 1.13, CI = 0.28 – 4.02, <i>p</i> = 1
G - A - G	1	1.8	ND	ND	ND
G - G - A	13	2.1	ND	ND	ND
A - A - G	ND	ND	ND	ND	ND
OR = Odds Ratio, CI = 95% Confidence Interval, ND = Not Determined, ^a Statistically significant p-value.					

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data 1. Clinical and laboratorial characteristics of the 143 studied Brazilian SLE patients.

Clinical/laboratorial characteristics	n (%)
Photosensitivity	42 (29.4%)
Serositis	36 (25.2%)
Arthritis	61 (42.6%)
Cutaneous alterations	84 (58.7%)
Neuropsychiatric disorder	29 (20.3%)
Nephritic disorder	80 (55.9%)
Hematological alterations	80 (55.9%)
Immunological alterations	87 (60.8%)
Antinuclear Factor positive (FAN)	115 (80.4%)
antiDNA Antibody (anti-dsDNA)	28 (19.6%)
Antiohospholipid syndrome (APS)	30 (21%)
Sjögren syndrome	4 (2.8%)
Raynaud phenomenon	7 (4.9%)
Hypertension Arterial Syndrome	47 (32.9%)

Supplementary data 2. Sequenced *FYB* gene SNPs.

	SNP	Position	Alleles
Promoter region	rs148851234*	39220175	T/C
	rs73072540	39220123	G/A
	rs73072537	39220107	T/C
	rs145544425*	39220093	G/A
	rs73072535	39220083	C/A
	rs13188259	39220055	G/A
	rs78946175	39220050	G/C
	rs73072533	39220012	T/A
	rs75605384	39219898	G/A
	rs185985055*	39219791	T/G
	rs181093449*	39219756	T/C
	rs34899678*	39219686:39219687	-/C
5'UTR	rs188757804*	39219656	G/C
	rs73072532	39219626	T/C
	rs6863066	39219615	G/A
3'UTR	rs404122	39107353	T/A
	rs188967678*	39107334	A/T
	rs3805577*	39107227	G/A
	rs182821574*	39107213	C/A
	rs2161612	39107100	T/C
	rs190589671*	39106938	T/C
	rs144080763*	39106924	T/C
	rs113675546*	39106904	T/G
	rs13172843*	39106800	G/A
	rs139321572*	39106705	G/A
	rs34711651*	39106695:39106696	-/C
	rs186164319*	39106661	T/C
	rs77258033*	39106627	T/G
	rs182539902*	39106603	T/A
	rs35840386*	39106579:39106580	-/C
	rs4421128*	39106528	G/A
	rs190371645*	39106481	C/A
	rs186006578*	39106371	T/C
	rs151211153*	39106233	G/A
	rs181750610*	39106038	G/A
	rs148716051*	39105994	G/C
	rs3805575*	39105959	G/A
	rs189425051*	39105945	G/A
	rs187018266*	39105709	G/A
	rs71818730*	39105619	A/-
	rs358501	39105594	A/G

* Monomorphic genetic variant

Supplementary data 3. Allele and genotype frequencies of all sequenced polymorphic SNPs in SLE patients and healthy controls.

FYB SNPs	Patients n=143 n (%)	Controls n=184 n (%)	OR, CI and p
rs73072540			
Alleles			
A	284 (99.3)	361 (98.1)	OR = 1
G	2 (0.7)	7 (1.9)	OR = 0.36, CI = 0.07- 1.76, $p = 0.19$
Genotypes			
A/A	141 (98.6)	177 (96.2)	OR = 1
A/G	2 (1.4)	7 (3.8)	OR = 0.36, CI = 0.07 - 1.75, $p = 0.18$
G/G	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 - Inf, $p = 1$
	HWE $p = 0.93$	HWE $p = 0.79$	
rs73072537			
Alleles			
T	284 (99.3)	361 (98.1)	OR = 1
C	2 (0.7)	7 (1.9)	OR = 0.36, CI = 0.07- 1.76, $p = 0.19$
Genotypes			
T/T	141 (98.6)	177 (96.2)	OR = 1
T/C	2 (1.4)	7 (3.8)	OR = 0.36, CI = 0.07 - 1.75, $p = 0.18$
C/C	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 - Inf, $p = 1$
	HWE $p = 0.93$	HWE $p = 0.79$	
rs73072535			
Alleles			
A	284 (99.3)	361 (98.1)	OR = 1
C	2 (0.7)	7 (1.9)	OR = 0.36, CI = 0.07- 1.76, $p = 0.19$
Genotypes			
A/A	141 (98.6)	177 (96.2)	OR = 1
A/C	2 (1.4)	7 (3.8)	OR = 0.36, CI = 0.07 - 1.75, $p = 0.18$
C/C	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 - Inf, $p = 1$
	HWE $p = 0.93$	HWE $p = 0.79$	
rs13188259			
Alleles			
G	175 (61.2)	271 (73.6)	OR = 1
A	111 (38.8)	97 (26.4)	OR = 1.77, CI = 1.27 - 2.47, $p = 0.001$
Genotypes			
G/G	50 (34.9)	101 (54.9)	OR = 1
G/A	75 (52.5)	69 (37.5)	OR = 2.2, CI = 1.37 - 3.52, $p = 0.001$

A/A	18 (12.6)	14 (7.6)	OR = 2.6, CI = 1.19 - 5.64, $p = 0.003$
	HWE $p = 0.21$	HWE $p = 0.64$	
rs78946175			
Alleles			
C	284 (99.3)	361 (98.1)	OR = 1
G	2 (0.7)	7 (1.9)	OR = 0.36, CI = 0.07- 1.76, $p = 0.19$
Genotypes			
C/C	141 (98.6)	177 (96.2)	OR = 1
C/G	2 (1.4)	7 (3.8)	OR = 0.36, CI = 0.07 - 1.75, $p = 0.18$
G/G	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 - Inf, $p = 1$
	HWE $p = 0.93$	HWE $p = 0.79$	
rs73072533			
Alleles			
T	284 (99.3)	361 (98.1)	OR = 1
A	2 (0.7)	7 (1.9)	OR = 0.36, CI = 0.07- 1.76, $p = 0.19$
Genotypes			
T/T	141 (98.6)	177 (96.2)	OR = 1
T/A	2 (1.4)	7 (3.8)	OR = 0.36, CI = 0.07 - 1.75, $p = 0.18$
A/A	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 - Inf, $p = 1$
	HWE $p = 0.93$	HWE $p = 0.79$	
rs75605384			
Alleles			
G	284 (98.6)	364 (100)	OR = 1
A	2 (1.4)	4 (0)	OR = 0.64, CI = 0.12 – 3.52, $p = 0.6$
Genotypes			
G/G	141 (97.2)	180 (100)	OR = 1
G/A	2 (2.8)	4 (0)	OR = 0.64, CI = 0.12 – 3.54, $p = 0.6$
A/A	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 – Inf, $p = 1$
	HWE $p = 0.93$	HWE $p = 0.88$	
rs73072532			
Alleles			
T	284 (99.3)	361 (98.1)	OR = 1
C	2 (0.7)	7 (1.9)	OR = 0.36, CI = 0.07- 1.76, $p = 0.19$
Genotypes			
T/T	141 (98.6)	177 (96.2)	OR = 1
T/C	2 (1.4)	7 (3.8)	OR = 0.36, CI = 0.07 - 1.75, $p = 0.18$
C/C	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 - Inf, $p = 1$
	HWE $p = 0.93$	HWE $p = 0.79$	
rs6863066			
Alleles			
G	174 (60.8)	289 (78.5)	OR = 1

A	112 (39.2)	79 (21.5)	OR = 2.35, CI = 1.64- 3.37, $p = 0.000001$
Genotypes			
G/G	53 (37.1)	113 (61.5)	OR = 1
G/A	68 (47.5)	63 (34.2)	OR = 2.29, CI = 1.39 - 3.79, $p = 0.0005$
A/A	22 (15.4)	8 (4.3)	OR = 5.8, CI = 2.31- 16.11, $p = 0.00002$
	HWE $p = 0.87$	HWE $p = 0.83$	
rs404122			
Alleles			
T	197 (68.9)	278 (75.5)	OR = 1
A	89 (31.1)	90 (24.5)	OR = 1.39, CI = 0.97 – 2.0, $p = 0.06$
Genotypes			
T/T	68 (47.6)	107 (58.1)	OR = 1
T/A	61 (42.7)	64 (34.8)	OR = 149.77, CI = 0.92 - 2.45, $p = 0.09$
A/A	14 (9.7)	13 (7.1)	OR = 1.7, CI = 0.69 - 4.17, $p = 0.21$
	HWE $p = 0.95$	HWE $p = 0.43$	
rs2161612			
Alleles			
T	207 (72.4)	255 (69.3)	OR = 1
C	79 (27.6)	113 (30.7)	OR = 0.86, CI = 0.60- 1.23, $p = 0.44$
Genotypes			
T/T	74 (51.7)	113 (48.4)	OR = 1
T/C	59 (41.3)	63 (41.8)	OR = 0.92, CI = 0.57 - 1.5, $p = 0.81$
C/C	10 (7)	8 (9.8)	OR = 0.67, CI = 0.26 – 1.64, $p = 0.41$
	HWE $p = 0.70$	HWE $p = 0.82$	
rs358501			
Alleles			
A	215 (75.2)	308 (83.7)	OR = 1
G	71 (24.8)	60 (16.3)	OR = 1.69, CI = 1.13-2.54, $p = 0.008$
Genotypes			
A/A	79 (55.2)	125 (68)	OR = 1
A/G	57 (39.9)	58 (31.5)	OR = 1.55, CI = 0.95 - 2.53, $p = 0.08$
G/G	7 (4.9)	1 (0.5)	OR = 10.96, CI = 1.36 - 501.81, $p = 0.008$
	HWE $p = 0.41$	HWE $p = 0.04$	
OR = Odds Ratio, CI = 95% Confidence Interval, HWE = Hardy-Weinberg Equilibrium			

FIGURES

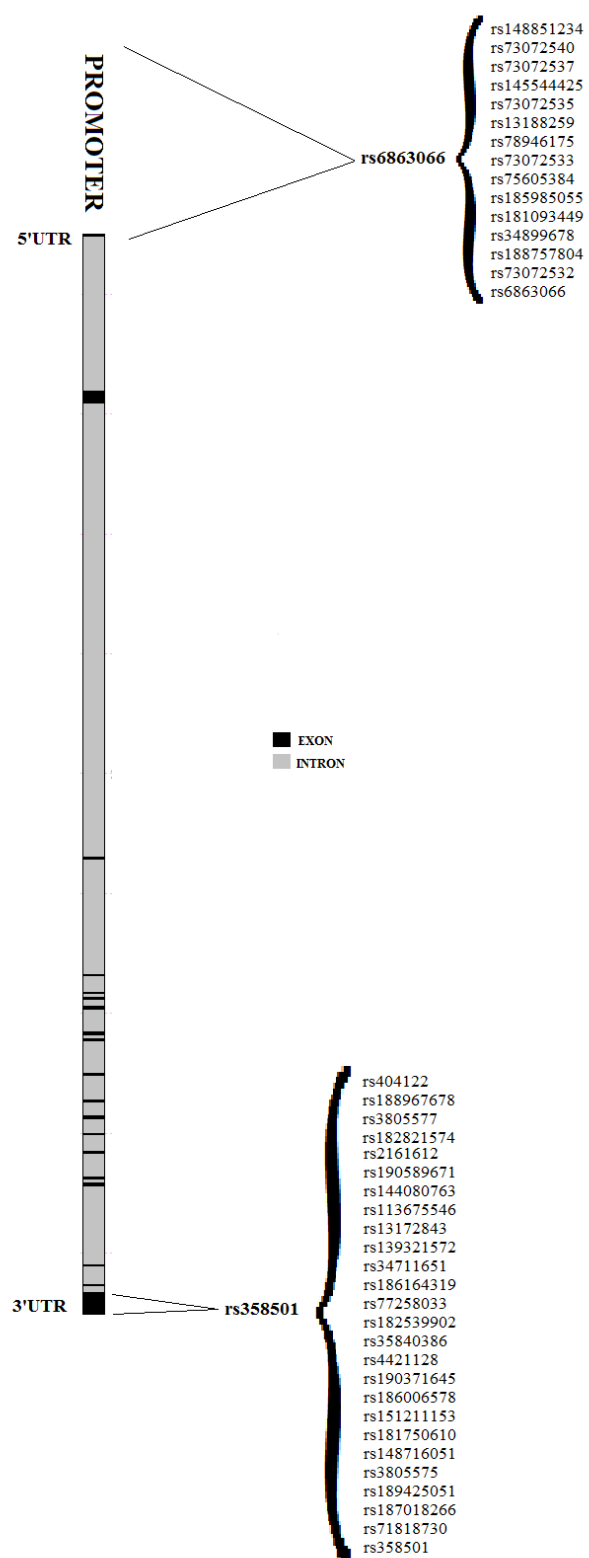


Figure 1. Sequenced SNPs in *FYB* gene.

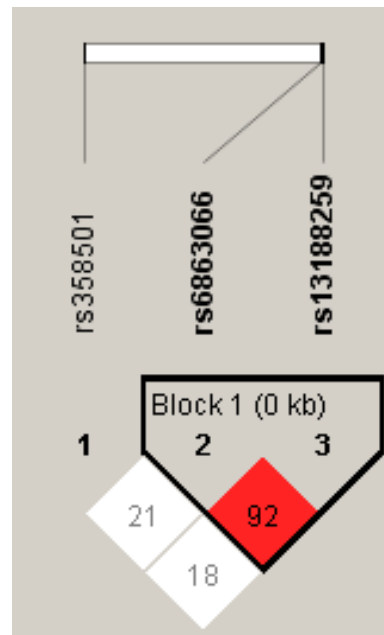


Figure 2. Linkage Disequilibrium surrounding the *FYB* SNPs found to be associated with Systemic Lupus Erythematosus.

ASSOCIATION OF *FYB* (FYN BINDING PROTEIN) GENE POLYMORPHISMS WITH SLE MANIFESTATIONS IN A NORTHEAST BRAZILIAN POPULATION

Authors

Catarina Addobbati^{a,c}, Thiago Sotero Fragoso^b, Andrea Tavares Dantas^b, Henrique de Ataíde Mariz^b, Laurindo Ferreira da Rocha Junior^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

FYB (Fyn Binding Protein) gene encodes an important adaptor protein of signal transduction pathway of T cell activation. In previous studies, we found an association of rs13188259 (promoter region), rs6863066 (5'UTR) and rs358501 (3'UTR) SNPs of *FYB* gene with SLE susceptibility and an association of rs379707 (Exon 15) SNP with antiDNA antibody production and rs2161612 (3'UTR) SNP with protection to hematological alterations occurrence in a Southeastern Brazilian population. The aim of this study was to replicate the association of the previously studied SNPs with SLE and its clinical and laboratorial manifestations in a population from the Northeast Brazilian. The study group comprised 116 SLE patients and 162 healthy controls from Pernambuco/Brazil. No association between the studied SNPs and SLE susceptibility was found. However, we observed various associations between the SNPs and susceptibility to development for patient's SLE manifestations: rs6863066 C>T and rs2161612 A>G SNPs with the occurrence of antiphospholipid syndrome; rs2161612 A>G SNP and serositis development and rs1642515 G>A, rs404122 A>T and of rs358501 T>C SNPs with the ulcers occurrence. Our results are not according with our previous findings in a Southeastern Brazilian population, indicating the necessity of more replica studies in others Brazilian populations to determine if ethnical and environmental differences play a role on SLE and its manifestations development. However, our findings indicate a possible involvement of *FYB* gene on SLE and its manifestations onset, contributing to a better knowledge of SLE pathogenesis.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus, *FYB*, SNP, manifestations.

INTRODUCTION

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease characterized by a high level of autoantibodies production and immune complex deposition leading to tissue injury. Patients with SLE are characterized by different clinical and laboratorial manifestations such as cutaneous, hematological and immunological alterations as well renal and neurological disorders [1]. The etiology of SLE is complex, involving genetic and environmental factors, which are likely to play a significant role in SLE susceptibility, determining the disease expression and clinical manifestations exhibited by SLE individuals [2].

The *FYB* (Fyn Binding Protein) gene (5p13.1) encodes the adaptor protein Fyb, also called ADAP (Adhesion and Degranulation Promoting Adaptor Protein) and SLAP-130 (SLP-76-Associated Phosphoprotein of 130 KDa), which plays a role in the regulation of T cell activation [3,4], participating in integrin-mediated adhesion [4] and cytoskeletal actin reorganization [5] in these cells. The regulation of T lymphocytes is considered one of the key points in the pathogenesis of autoimmune diseases, making the *FYB* gene a good candidate for the study of SLE. In previous studies [Personal Communication], we found an association of three SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) of *FYB* gene with SLE susceptibility: rs13188259 C>T (promoter region), rs6863066 C>T (5'UTR) and rs358501 T>C (3'UTR), and two SNPs with antiDNA antibody production and protection to hematological disorders: rs379707 A>C (exon 15) and rs2161612 A>G (3'UTR) respectively in a Southeastern Brazilian population. The aim of this study was to confirm by a replica study the association of the *FYB* SNPs in SLE in a Northeastern Brazilian population.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

One hundred and sixteen female patients (mean age 37.5 ± 10.4) from Division of Rheumatology, Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco, Brazil, who fulfilled the American College of Rheumatology Criteria for SLE diagnosis, were included in this study. Clinical and laboratorial data regarding the SLE patients were collected (Table 1). The ethnic classification as European- or African-derived was determined according to individual phenotypic characteristics and ethnicity data of parents/grandparents following the skin color-based classification criteria adopted in Brazil [6,7]. Twenty nine individuals were classified as European-derived (25%) and eighty seven as African-derived (75%).

The control group consisted of one hundred sixty two female healthy blood donors (mean age 39.7 ± 14.8) recruited from the same geographic area of SLE patients. Sixty four were classified as European-derived (40%) and ninety eight as African-derived (60%). None individuals control presented previous family history of autoimmune disorders. 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 study

Genomic DNA was extracted from blood samples collected with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as an anticoagulant, using DNA Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) according to the standard protocol from the manufacturer. For SNPs genotyping, fluorogenic allele specific probes (Taqman Probes, Applied Biosystems, Foster City, CA) were used on an ABI7500 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA).

SNPs selection

The studied SNPs were selected according to our previous studies realized by our group. We choose for genotyping the five previously associated SNPs – rs13188259 C>T (promoter region), rs6863066 C>T (5'UTR), rs379707 A>C (exon 15), rs2161612 A>G (3'UTR) and rs358501 T>C (3'UTR) – and two more SNPs – rs1642515 G>A (exon 2) and rs404122 A>T (3'UTR) - in order to evaluate a possible association.

Statistical Analysis

Genotype frequencies and Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) were performed by Genotype Transposer. The distribution of alleles and genotypes according to patient's clinical and laboratorial features were obtained using the EpiInfo version 3.5.1 software (www.cdc.gov/epiinfo/about.htm). Fisher's test was used to test allelic and genotypic associations with SLE susceptibility and manifestations. The R 2.10.0 (www.r-project.org/) software was used to calculate odds ratio (ORs) and 95% confidence intervals (95% CI). *FYB* haplotypes data were computed using SNPstat (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) and Haploview Software (www.hapmap.org/haploview). *P-value* < 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Association of *FYB* SNPs with susceptibility to SLE

The distribution of allele and genotype frequencies of the studied *FYB* SNPs in SLE patients and controls individuals is shown in Supplementary 1. Genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium with the exception of rs404122 A>T SNP in the control group ($p = 0.03$). There were no statistically significant differences when comparing allelic and

genotypic frequencies of SLE patients and controls individuals for the seven analyzed SNPs in this study.

Even after stratification for ethnicity, we did not find any association between the studied SNPs and SLE susceptibility in European or African-derived group (Supplementary 2).

Correlation between FYB SNPs and clinical/laboratorial manifestations in SLE patients

The association of *FYB* gene polymorphisms with clinical and laboratorial manifestations of SLE patients was also analyzed. We found an association of five of seven studied SNPs with susceptibility for manifestations development presented by SLE patients (Table 2). The T allele (OR = 3.5, CI = 1.13 – 10.83, $p = 0.02$) and T/T genotype (OR = 11.8, CI = 1.1 – 123.3, $p = 0.01$) of rs6863066 C>T SNP and G allele (OR = 3.9, CI = 1.26 – 12.03, $p = 0.01$) and G/G genotype (OR = 8.15, CI = 1.3 – 49.5, $p = 0.002$) of rs2161612 A>G SNP were associated with antiphospholipid syndrome. An association between G allele and G/G genotype of rs2161612 A>G SNP and serositis was also observed (OR = 2.4, CI = 1.28 – 4.6, $p = 0.005$; OR = 5.22, CI = 1.6 – 17.6, $p = 0.004$, respectively). We also found an association of A allele (OR = 4.4, CI = 1.22 – 15.96, $p = 0.01$) and G/A genotype (OR = 4.89, CI = 1.3 – 18.6, $p = 0.01$) of rs1642515 G>A SNP, T allele (OR = 2.14, CI = 1.1 – 4.2, $p = 0.03$) and T/T genotype (OR = 5.3, CI = 1.42 – 19.8, $p = 0.006$) of rs404122 A>T SNP and C allele (OR = 2.4, CI = 1.2 – 4.9, $p = 0.01$) and C/C genotype (OR = 8.6, CI = 1.8 – 40.9, $p = 0.002$) of rs358501 T>C SNP with occurrence of oral ulcers in SLE patients.

DISCUSSION

SLE shows a strong genetic predisposition with a high concordance in identical twins and increased frequency among first-degree relatives of patients. The genetic component of disease susceptibility involves a set of unlinked genes that operate in concert to induce SLE [8]. Since *FYB* gene is involved on T cell activation and dysregulations in this cell type could be the starting point of an autoimmune process, we considered this gene a candidate to operate in SLE development. However, the present study shows that none of the seven studied SNPs in *FYB* gene is associated with the risk for SLE in a Northeastern Brazilian population.

When we analyzed the possible association between the studied SNPs and the occurrence of SLE clinical and laboratorial manifestations, six associations were observed. Our results shows that SLE patients carrying G allele and G/G genotype of rs2161612 A>G SNP have a significant increased risk to develop antiphospholipid syndrome (OR = 3.9, OR = 8.15, respectively) and serositis (OR = 2.4, OR = 5.22). In the same way, the T allele (OR = 3.5) and T/T genotype (OR = 11.8) of rs6863066 C>T SNP also showed to confer an increased risk to antiphospholipid syndrome development.

One of the main autoantibodies in SLE is the antiphospholipid antibody, which acts directly against components of the cell membrane, interfering in the coagulation process and endothelial cells function. As a result, there is an increased expression of adhesion molecules on the surface of cells and induction of tissue factor, causing platelet aggregation and thrombus formation. These events together are called antiphospholipid syndrome [9]. Since *Fyb* protein participates in T cell activation [3,4], which is involved in autotolerance process of the immune system [10], polymorphisms in *FYB* gene, such as rs6863066 and rs2161612, located at 5'UTR and 3'UTR, could be involved on changes in the protein synthesis or

stability, influencing the existence of autoreactive cells and, in consequence, the autoantibodies release, including antiphospholipid antibodies, leading to antiphospholipid syndrome.

An association of A allele (OR = 4.4) and G/A genotype (OR = 4.89) of rs1642515 G>A SNP, T allele (OR = 2.14) and T/T genotype (OR = 5.3) of rs404122 A>T SNP and C allele (OR = 2.4) and C/C genotype (OR = 8.6) of rs358501 T>C SNP with oral ulcers occurrence was also observed among studied SLE patients. Oral ulcers, which are very common in SLE patients, are one of the eleven criteria used by the American College of Rheumatology to classify SLE [11,12,13]. The present study suggests that SNPs in 3'UTR (rs404122 and rs358501) and exon 2 (rs1642515) of *FYB* gene could cause ulcers development.

Fyb protein is also expressed in neutrophils, which are cells directly involved in inflammatory processes [14]. Neutrophils migrate quickly to the site of inflammation, contributing to the inflammatory response establishment. This process is permitted by the adhesion of neutrophils to endothelial molecules through the activation of integrin [15]. Since Fyb protein showed to participate in integrin-mediated adhesion [4] and ulcers formation is characterized by an inflammatory process, polymorphisms in 3'UTR and the substitution of the proline to leucine aminoacid caused by the rs1642515 SNP in exon 2 of *FYB* gene could cause an impaired concentration or function of this protein and, in consequence, a deregulation of neutrophil recruitment and then an exacerbated oral ulcers development in SLE patients. We can also hypothesize that an impaired Fyb protein activity leads to autoantibodies release and increases the immune complexes deposition, triggering an inflammatory response and possible oral ulcers development.

Our results are not according with previous findings in a Southeastern Brazilian population, in which we found an association of rs13188259, rs6863066 and rs358501 SNPs with SLE susceptibility and rs379707 and rs2161612 SNPs with anti-DNA antibody production and protection to hematological alterations, respectively. It is known that genetic heterogeneity can be a problem when we perform association studies in populations characterized by an admixture of ethnicities as in Brazilian populations. However, more replica studies in others Brazilian populations are necessary to determine if the ethnical differences play a role on SLE development. Moreover, since SLE is a multifactorial disease, environmental differences between northeastern and southeastern regions could also influence SLE and its manifestations development.

All this considered, our results show evidences of the involvement of *FYB* gene on clinical manifestations onset in SLE patients. However, the role of Fyb protein in T cells activation and inflammatory response is still to be elucidated. Nevertheless, further study of the functional analysis of polymorphisms on the *FYB* gene and population studies in different ethnic groups should be performed in the future.

CONCLUSION

We showed the association between five SNPs of *FYB* gene and ulcers, antiphospholipid syndrome and serositis occurrence among SLE patients of a Northeastern Brazilian population, suggesting the involvement of Fyb protein on manifestations exhibited in SLE disease. However, since we do not find the same results in this replica study, ethnical and environmental influence on SLE and its manifestations development has to be elucidated.

REFERENCES

- [1] Kyttaris VC (2010) Systemic lupus erythematosus: from genes to organ damage. *Methods Mol Biol* 662:265-83.
- [2] Crispín JC, Liossis SN, Kis-Toth K, Lieberman LA, Kyttaris VC, Juang YT, Tsokos GC (2010) Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med* 16 (2):47-57.
- [3] Griffiths EK, Krawczyk C, Kong YY, Raab M, Hyduk SJ, Bouchard D, Chan VS, Kozieradzki I, Oliveira-Dos-Santos AJ, Wakeham A, Ohashi PS, Cybulsky MI, Rudd CE, Penninger JM (2001) Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap. *Science* 293 (5538):2260-3.
- [4] Wang H, Rudd CE (2008) SKAP-55, SKAP-55-related and ADAP adaptors modulate integrin-mediated immune-cell adhesion. *Trends Cell Biol* 18 (10):486-93.
- [5] Pauker MH, Reicher B, Fried S, Perl O, Barda-Saad M (2011) Functional cooperation between the proteins Nck and ADAP is fundamental for actin reorganization. *Mol Cell Bio* 31 (13):2653-2666.
- [6] Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, Bortolini MC, Chies JA (2006) Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res* 39 (3):321-5.
- [7] Veit TD, Cordero EA, Mucenic T, Monticelo OA, Brenol JC, Xavier RM, Delgado-Cañedo A, Chies JA (2009) Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 18 (5):424-30.
- [8] Deng, Y, Tsao BP (2010) Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol* 6 (12):683-692.
- [9] Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA (2010) Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 376 (9751):1498-1509.
- [10] Abbas, AK, Lichtman, AH, Pillai, S (2008) *Cellular and Molecular Immunology*, Elsevier, Philadelphia.

- [11] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ (1982) The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25 (11):1271-1277.
- [12] Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, Bacon P, Bombardieri S, Hanly J, Hay E, Isenberg D, Jones J, Kalunian K, Maddison P, Nived O, Petri M, Richter M, Sanchez-Guerrero J, Snaith M, Sturfelt G, Symmons D, Zoma A (1996) The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 39 (3):363-369.
- [13] Hochberg, MC (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40 (9):1725.
- [14] Block H, Herter JM, Rossaint J, Stadtmann A, Kliche S, Lowell CA, Zarbock A (2012) Crucial role of SLP-76 and ADAP for neutrophil recruitment in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J Exp Med* 209 (2):407-21.
- [15] Ley K., Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol* 7 (9):678–689.

TABLES

Table 1. Clinical and laboratorial characteristics of the 116 studied SLE patients.

Clinical/laboratorial characteristics	n (%)
Photosensitivity	80 (69%)
Rash malar	72 (62%)
Rash discoid	22 (19%)
Oral ulcers	23 (20%)
Serositis	25 (22%)
Arthritis	84 (72%)
Neuropsychiatric disorder	8 (7%)
Nephritic disorder	60 (52%)
Hematological alterations	77 (66%)
Immunological alterations	38 (33%)
Antinuclear Factor positive (FAN)	107 (92%)
Antibody anti DNA (anti ds-DNA)	29 (25%)
Antibody anti- Sm	10 (9%)
Antiphospholipid syndrome (APS)	7 (6%)

Table 2. SLE patients' clinical and laboratorial manifestation accordingly to associated *FYB* gene SNPs.

ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME				ORAL ULCERS			
	Present	Absent			Present	Absent	
rs6863066	n (%)	n (%)	OR, CI, <i>p</i>	rs1642515	n (%)	n (%)	OR, CI, <i>p</i>
Alleles				Alleles			
C	5 (36)	144 (66)	OR =1	G	41 (89)	181 (97)	OR =1
T	9 (64)	74 (34)	OR = 3.5, CI = 1.13 – 10.83, <i>p</i> = 0.02 ^a	A	5 (11)	5 (3)	OR = 4.4, CI = 1.22 – 15.96, <i>p</i> = 0.01 ^a
Genotypes				Genotypes			
C/C	1 (14)	47 (43)	OR = 1	G/G	18 (78)	88 (95)	OR = 1
C/T	3 (43)	50 (46)	OR = 2.82, CI = 0.3 – 28.1, <i>p</i> = 0.2	G/A	5 (22)	5 (5)	OR = 4.89, CI = 1.3 – 18.6, <i>p</i> = 0.01 ^a
T/T	3 (43)	12 (11)	OR = 11.8, CI = 1.1 – 123.3, <i>p</i> = 0.01 ^a	A/A	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 – Inf, <i>p</i> = 1
ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME				ORAL ULCERS			
	Present	Absent			Present	Absent	
rs2161612	n (%)	n (%)	OR, CI, <i>p</i>	rs404122	n (%)	n (%)	OR, CI, <i>p</i>
Alleles				Alleles			
A	5 (36)	149 (68)	OR =1	A	27 (59)	140 (75)	OR =1
G	9 (64)	69 (32)	OR = 3.9, CI = 1.26 – 12.03, <i>p</i> = 0.01 ^a	T	19 (41)	46 (25)	OR = 2.14, CI = 1.1 – 4.2, <i>p</i> = 0.03 ^a
Genotypes				Genotypes			
A/A	2 (29)	53 (49)	OR = 1	A/A	10 (43)	53 (57)	OR = 1
A/G	1 (14)	43 (39)	OR = 0.62, CI = 0.05 – 7.03, <i>p</i> = 0.2	A/T	7 (30)	34 (37)	OR = 1.1, CI = 0.38 – 3.14, <i>p</i> = 0.4
G/G	4 (57)	13 (12)	OR = 8.15, CI = 1.3 – 49.5, <i>p</i> = 0.002 ^a	T/T	6 (26)	6 (6)	OR = 5.3, CI = 1.42 – 19.8, <i>p</i> = 0.006 ^a
SEROSITIS				ORAL ULCERS			
	Present	Absent			Present	Absent	
rs2161612	n (%)	n (%)	OR, CI, <i>p</i>	rs358501	n (%)	n (%)	OR, CI, <i>p</i>
Alleles				Alleles			
A	25 (50)	129 (71)	OR =1	T	30 (65)	152 (82)	OR =1
G	25 (50)	53 (29)	OR = 2.4, CI = 1.28 – 4.6, <i>p</i> = 0.005 ^a	C	16 (35)	34 (18)	OR = 2.4, CI = 1.2 – 4.9, <i>p</i> = 0.01 ^a
Genotypes				Genotypes			
A/A	8 (32)	47 (52)	OR = 1	T/T	12 (52)	62 (67)	OR = 1
A/G	9 (36)	35 (38)	OR = 1.51, CI = 0.53 – 4.31, <i>p</i> = 0.2	T/C	6 (26)	28 (30)	OR = 1.1, CI = 0.38 – 3.25, <i>p</i> = 0.4
G/G	8 (32)	9 (10)	OR = 5.22, CI = 1.6 – 17.6, <i>p</i> = 0.004 ^a	C/C	5 (22)	3 (3)	OR = 8.6, CI = 1.8 – 40.9, <i>p</i> = 0.002 ^a
OR = Odds Ratio, CI = 95% Confidence Interval, <i>p</i> = p-value, ^a Statistically significant p-value							

Supplementary data 1. Allele and genotype frequencies of *FYB* SNPs analyzed in SLE patients and healthy controls.

<i>FYB</i> SNPs	Patients n=116 n (%)	Controls n=162 n (%)	OR, CI and <i>p</i>
rs13188259			
Alleles			
C	146 (62.9)	206 (63.6)	OR = 1
T	86 (37.1)	118 (36.4)	OR = 1.03, CI = 0.72 - 1.46, <i>p</i> = 0.88
Genotypes			
C/C	48 (41.4)	62 (38.3)	OR = 1
C/T	50 (43.1)	82 (50.6)	OR = 0.8, CI = 0.47 - 1.32, <i>p</i> = 0.32
T/T	18 (15.5)	18 (11.1)	OR = 1.3, CI = 0.61 - 2.75, <i>p</i> = 0.28
	HWE <i>p</i> = 0.41	HWE <i>p</i> = 0.24	
rs6863066			
Alleles			
C	149 (64.2)	215 (66.4)	OR = 1
T	83 (35.8)	109 (33.6)	OR = 1.1, CI = 0.77 - 1.57, <i>p</i> = 0.60
Genotypes			
C/C	48 (41.4)	72 (44.5)	OR = 1
C/T	53 (45.7)	71 (43.8)	OR = 1.12, CI = 0.67 - 1.86, <i>p</i> = 0.65
T/T	15 (12.9)	19 (11.7)	OR = 1.18, CI = 0.55 - 2.56, <i>p</i> = 0.63
	HWE <i>p</i> = 0.95	HWE <i>p</i> = 0.81	
rs1642515			
Alleles			
G	222 (95.7)	314 (97)	OR = 1
A	10 (4.3)	10 (3)	OR = 1.41, CI = 0.58- 3.46, <i>p</i> = 0.44
Genotypes			
G/G	106 (91.4)	152 (93.8)	OR = 1
G/A	10 (8.6)	10 (6.2)	OR = 1.43, CI = 0.58 - 3.57, <i>p</i> = 0.44
A/A	0 (0)	0 (0)	OR = ND , CI = ND, <i>p</i> = ND
	HWE <i>p</i> = 0.63	HWE <i>p</i> = 0.68	
rs379707			
Alleles			
A	130 (56)	178 (54.9)	OR = 1
C	102 (44)	146 (45.1)	OR = 0.96, CI = 0.68 - 1.34, <i>p</i> = 0.8
Genotypes			
A/A	37 (31.9)	52 (32.1)	OR = 1
A/C	56 (48.3)	74 (45.7)	OR = 1.06, CI = 0.62 - 1.84, <i>p</i> = 0.75

C/C	23 (19.8) HWE $p = 0.83$	36 (22.2) HWE $p = 0.32$	OR = 0.9, CI = 0.46 – 1.76, $p = 0.67$
rs404122			
Alleles			
A	167 (72)	228 (70.4)	OR = 1
T	65 (28)	96 (29.6)	OR = 0.92, CI = 0.64 – 1.34, $p = 0.68$
Genotypes			
A/A	63 (54.3)	86 (53.1)	OR = 1
A/T	41 (35.3)	56 (34.6)	OR = 1, CI = 0.6 – 1.68, $p = 0.86$
T/T	12 (10.4) HWE $p = 0.18$	20 (12.3) HWE $p = 0.03$	OR = 0.82, CI = 0.37 – 1.8, $p = 0.61$
rs2161612			
Alleles			
A	154 (66.4)	213 (65.7)	OR = 1
G	78 (33.6)	111 (34.3)	OR = 0.97, CI = 0.68 – 1.39, $p = 0.88$
Genotypes			
A/A	55 (47.4)	69 (42.6)	OR = 1
A/G	44 (37.9)	75 (46.3)	OR = 0.74, CI = 0.44 – 1.23, $p = 0.23$
G/G	17 (14.7) HWE $p = 0.11$	18 (11.1) HWE $p = 0.72$	OR = 1.18, CI = 0.56 – 2.51, $p = 0.31$
rs358501			
Alleles			
T	182 (78.4)	260 (80.2)	OR = 1
C	50 (21.6)	64 (19.8)	OR = 1.12, CI = 0.74 – 1.69, $p = 0.6$
Genotypes			
T/T	74 (63.8)	108 (66.6)	OR = 1
T/C	34 (29.3)	44 (27.2)	OR = 1.13, CI = 0.66 – 1.93, $p = 0.66$
C/C	8 (6.9) HWE $p = 0.15$	10 (6.2) HWE $p = 0.07$	OR = 1.17, CI = 0.44 – 3.1, $p = 0.71$

OR = Odds Ratio, CI = 95% Confidence Interval, p = p-value, HWE = Hardy-Weinberg Equilibrium.

Supplementary data 2. Allele and genotype frequencies of *FYB* SNPs in SLE patients and healthy controls after stratification for ethnicity.

EUROPEAN-DERIVED				AFRICAN-DERIVED		
	Patients	Controls	OR, CI and <i>p</i>	Patients	Controls	OR, CI and <i>p</i>
	n = 29	n = 64		n = 87	n = 98	
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
rs13188259						
Alleles						
C	41 (70.7)	97 (75.8)	OR = 1	105 (60.3)	109 (55.6)	OR = 1
T	17 (29.3)	31 (24.2)	OR = 1.3, CI = 0.65 - 2.6, <i>p</i> = 0.46	69 (39.7)	87 (44.4)	OR = 0.82, CI = 0.54 - 1.25, <i>p</i> = 0.36
Genotypes						
C/C	15 (51.7)	35 (54.7)	OR = 1	33 (37.9)	27 (27.6)	OR = 1
C/T	11 (38)	27 (42.2)	OR = 0.95, CI = 0.38 - 2.4, <i>p</i> = 0.73	39 (44.8)	55 (56.1)	OR = 0.58, CI = 0.3 - 1.12, <i>p</i> = 0.10
T/T	3 (10.3)	2 (3.1)	OR = 3.5, CI = 0.53 - 23.1, <i>p</i> = 0.16	15 (17.2)	16 (16.3)	OR = 0.77, CI = 0.32 - 1.83, <i>p</i> = 0.21
	HWE	HWE		HWE	HWE	
	<i>p</i> = 0.65	<i>p</i> = 0.23		<i>p</i> = 0.55	<i>p</i> = 0.18	
rs6863066						
Alleles						
C	44 (75.9)	102 (79.7)	OR = 1	105 (60.3)	113 (57.7)	OR = 1
T	14 (24.1)	26 (20.3)	OR = 1.25, CI = 0.6 - 2.62, <i>p</i> = 0.56	69 (39.7)	83 (42.3)	OR = 0.89, CI = 0.59 - 1.36, <i>p</i> = 0.6
Genotypes						
C/C	16 (55.2)	40 (62.5)	OR = 1	32 (36.8)	32 (32.7)	OR = 1
C/T	12 (41.4)	22 (34.4)	OR = 1.36, CI = 0.55 - 3.39, <i>p</i> = 0.5	41 (47.1)	49 (50)	OR = 0.84, CI = 0.44 - 1.59, <i>p</i> = 0.58
T/T	1 (3.4)	2 (3.1)	OR = 1.25, CI = 0.1 - 14.8, <i>p</i> = 0.67	14 (16.1)	17 (17.3)	OR = 0.82, CI = 0.35 - 1.95, <i>p</i> = 0.6
	HWE	HWE		HWE	HWE	
	<i>p</i> = 0.48	<i>p</i> = 0.62		<i>p</i> = 0.89	<i>p</i> = 0.81	
rs1642515						
Alleles						
G	56 (96.6)	127 (99)	OR = 1	166 (95.4)	187 (95)	OR = 1

A	2 (3.4)	1 (1)	OR = 4.53, CI = 0.4 - 51.1, <i>p</i> = 0.18	8 (4.6)	9 (5)	OR = 1, CI = 0.38 - 2.65, <i>p</i> = 0.99
Genotypes						
G/G	27 (93.1)	63 (98.4)	OR = 1	79 (90.8)	89 (90.8)	OR = 1
G/A	2 (6.9)	1 (1.6)	OR = 4.7, CI = 0.41 – 53.7, <i>p</i> = 0.17	8 (9.2)	9 (9.2)	OR = 1, CI = 0.37 - 2.72, <i>p</i> = 0.52
A/A	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 – Inf, <i>p</i> = 1	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 - Inf, <i>p</i> = 1
	HWE	HWE		HWE	HWE	
	<i>p</i> = 0.85	<i>p</i> = 0.95		<i>p</i> = 0.65	<i>p</i> = 0.63	
rs379707						
Alleles						
A	33 (57)	77 (60.2)	OR = 1	97 (55.7)	101 (51.5)	OR = 1
C	25 (43)	51 (39.8)	OR = 1.14, CI = 0.6 - 2.1, <i>p</i> = 0.67	77 (44.3)	95 (48.5)	OR = 0.84, CI = 0.56 - 1.27, <i>p</i> = 0.42
Genotypes						
A/A	9 (31)	26 (40.6)	OR = 1	28 (32.2)	26 (26.5)	OR = 1
A/C	15 (51.7)	25 (39.1)	OR = 1.73, CI = 0.6 – 4.7, <i>p</i> = 0.27	41 (47.1)	49 (50)	OR = 0.78, CI = 0.4 - 1.53, <i>p</i> = 0.45
C/C	5 (17.3)	13 (20.3)	OR = 1.1, CI = 0.3 – 4, <i>p</i> = 0.44	18 (20.7)	23 (23.5)	OR = 0.73, CI = 0.32 – 1.64, <i>p</i> = 0.42
	HWE	HWE		HWE	HWE	
	<i>p</i> = 0.77	<i>p</i> = 0.14		<i>p</i> = 0.68	<i>p</i> = 0.99	
rs404122						
Alleles						
A	42 (72)	92 (71.9)	OR = 1	125 (72)	136 (69.4)	OR = 1
T	16 (28)	36 (28.1)	OR = 0.97, CI = 0.5 - 1.9, <i>p</i> = 0.94	49 (28)	60 (30.6)	OR = 0.89, CI = 0.57 - 1.39, <i>p</i> = 0.61
Genotypes						
A/A	16 (55.2)	35 (54.7)	OR = 1	47 (54)	51 (53)	OR = 1
A/T	10 (34.5)	22 (34.4)	OR = 0.99, CI = 0.4 – 2.6, <i>p</i> = 0.98	31 (35.6)	34 (34.7)	OR = 0.99, CI = 0.53 - 1.85, <i>p</i> = 0.83
T/T	3 (10.3)	7 (10.9)	OR = 0.94, CI = 0.2 – 4.1, <i>p</i> = 0.93	9 (10.4)	13 (13.3)	OR = 0.75, CI = 0.29 – 1.92, <i>p</i> = 0.54
	HWE	HWE		HWE	HWE	
	<i>p</i> = 0.46	<i>p</i> = 0.23		<i>p</i> = 0.27	<i>p</i> = 0.07	
rs2161612						

Alleles

A	41 (71)	84 (65.6)	OR = 1	113 (65)	129 (65.8)	OR = 1
G	17 (29)	44 (34.4)	OR = 0.79, CI = 0.4 - 1.55, $p = 0.49$	61 (35)	67 (34.2)	OR = 1.04, CI = 0.7 - 1.6, $p = 0.86$

Genotypes

A/A	14 (48.3)	27 (42.2)	OR = 1	41 (47.1)	42 (42.9)	OR = 1
A/G	13 (44.8)	30 (46.9)	OR = 0.84, CI = 0.33 - 2.1, $p = 0.66$	31 (35.6)	45 (45.9)	OR = 0.71, CI = 0.38 - 1.32, $p = 0.24$
G/G	2 (6.9)	7 (10.9)	OR = 0.55, CI = 0.1 - 3.01, $p = 0.47$	15 (17.3)	11 (11.2)	OR = 1.4, CI = 0.57 - 3.4, $p = 0.24$
	HWE	HWE		HWE	HWE	
	$p = 0.66$	$p = 0.75$		$p = 0.04$	$p = 0.84$	

rs358501**Alleles**

T	45 (77.6)	99 (77.3)	OR = 1	137 (78.7)	161 (82.1)	OR = 1
C	13 (22.4)	29 (22.7)	OR = 0.99, CI = 0.5 - 2.1, $p = 0.97$	37 (21.3)	35 (17.9)	OR = 1.24, CI = 0.74 - 2.1, $p = 0.41$

Genotypes

T/T	17 (58.6)	40 (62.5)	OR = 1	57 (65.5)	68 (69.4)	OR = 1
T/C	11 (37.9)	19 (29.7)	OR = 1.36, CI = 0.5 - 3.5, $p = 0.49$	23 (26.4)	25 (25.5)	OR = 1.1, CI = 0.56 - 2.1, $p = 0.73$
C/C	1 (3.5)	5 (7.8)	OR = 0.47, CI = 0.05 - 4.3, $p = 0.42$	7 (8.1)	5 (5.1)	OR = 1.7, CI = 0.5 - 5.6, $p = 0.4$
	HWE	HWE		HWE	HWE	
	$p = 0.62$	$p = 0.22$		$p = 0.05$	$p = 0.2$	

OR = Odds Ratio, CI = 95% Confidence Interval, p = p-value, HWE = Hardy-Weinberg Equilibrium.

CONCLUSÕES FINAIS

1. Foi observada a associação do SNP rs13188259 G>A, localizado no promotor do gene *FYB*, com a susceptibilidade ao LES na população de Ribeirão Preto/SP.
2. Não foram encontradas associações entre os SNPs próximos aos TagSNPs previamente associados e as principais manifestações clínicas e laboratoriais do LES na população de Ribeirão Preto/SP.
3. Não foram encontradas associações entre os SNPs previamente estudados na população de Ribeirão Preto/SP com o desenvolvimento do LES na população de Pernambuco.
4. Foram observadas a associação dos SNPs rs6863066 C>T e rs2161612 A>G com o desenvolvimento da síndrome do anticorpo antifosfolípideo; do SNP 2161612 A>G com a serosite; e dos SNPs rs1642515 G>A, rs404122 A>T e rs358501 T>C com a ocorrência de úlceras nos pacientes com LES da população de Pernambuco.
5. Não foram encontrados fatores de risco ou proteção ao desenvolvimento do LES e suas manifestações clínicas e laboratoriais comuns às populações de Ribeirão Preto/SP e Pernambuco.
6. Esses resultados sugerem um possível envolvimento do gene *FYB* no desenvolvimento do LES e suas manifestações clínicas e laboratoriais, contribuindo para uma maior compreensão na patogênese do LES.

ANEXO A – ARTIGO

Título

FYB GENE POLYMORPHISMS ARE ASSOCIATED WITH SUSCEPTIBILITY FOR
SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS (SLE)

Autores

Catarina Addobbati, João Alexandre Três Pancotto, Eduardo Antônio Donadi, Sergio Crovella, Ludovica Segat, Paula Sandrin-Garcia.

Artigo submetido à Revista Human Immunology (Fator de impacto: 2.837)

***FYB* gene polymorphisms are associated with susceptibility for Systemic Lupus Erythematosus (SLE)**

Catarina Addobbati^a, João Alexandre Três Pancotto^b, Eduardo Antônio Donadi^b, Sergio Crovella^d, Ludovica Segat^c, Paula Sandrin-Garcia^{a,d}.

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

^b Division of Clinical Immunology, Department of Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP Brazil.

^c Institute for Maternal and Child Health - IRCCS “Burlo Garofolo” – Trieste, Italy.

^d Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Running title:

FYB gene polymorphisms in SLE

***Corresponding author:**

Ludovica Segat

IRCCS Burlo Garofolo,

Via dell'Istria 65/1,

34137 Trieste, Italy

tel. +39.040.3785422, fax. +39.040.3785422/+39.040.3785540

e-mail: segat@burlo.trieste.it

Abstract

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a multifactorial autoimmune disease affecting different organs or systems. Several genes have been associated with SLE susceptibility so far. A previous study has reported, in SLE patients, a differential expression of Fyn Binding Protein gene (*FYB*), encoding for a protein participating in the T cells signaling cascade and in the interleukin-2A expression modulation.

This study investigates the association of 10 *FYB* SNPs with differential susceptibility to SLE in 143 SLE patients and 184 controls from Southern Brazil. Significant differences were observed when comparing allele and genotype frequencies distribution in patients and controls: the T allele for rs6863066 C>T SNP and C for rs358501 T>C SNP were significantly more frequent in SLE patients than in controls ($p = 0.0002$ and $p = 0.008$) and associated with an increased risk for SLE (OR=1.93 and OR=1.69). The frequencies of rs6863066 C/T and T/T and rs358501 C/C genotypes were significantly higher in patients than in controls ($p = 0.001$, $p = 0.006$ and $p = 0.008$). A significant association was also found for the rs6863066-rs358501 T-T and T-C haplotypes (OR = 2.06, $p = 0.002$ and OR = 2.93, $p = 0.001$).

When considering clinical and laboratorial manifestations, an association was found between rs2161612 G allele and G/G genotype and hematological alterations ($p = 0.008$) and rs379707 A/C genotype and anti-dsDNA ($p = 0.01$).

In conclusion, our findings indicate an association between polymorphisms located in *FYB* gene and SLE, suggesting their possible involvement in disease susceptibility and clinical manifestations.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus; Fyn Binding Protein; *FYB* gene; genetic polymorphisms, susceptibility.

1. Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease that may affect any organ or system. It is characterized by different clinical/laboratorial manifestations such as cutaneous, hematological or immunological alterations, as well as renal and neurological disorders [1]. Despite its unknown etiology, genetic, hormonal, immunological and environmental factors are supposed to be involved in the pathogenesis of this multifactorial disease [2,3]. When considering the impact of the genetic influence on differential susceptibility to SLE, the strongest associations known are with variants located at the major histocompatibility complex (MHC) on the chromosome 6, in particular the *HLA* class II *HLA-DRB1*1501* and *HLA-DRB*0301* [4, 5, 6]. However, the advent of genome wide association studies (GWAS) has expanded the number of genes associated to SLE protection/susceptibility, especially those involved into immune-related pathways, such as *PTPN22*, *FCGR2B*, *STAT4*, *CTLA4*, *PDCD1*, *IRF5*, *ITGAM* and *MBL2* [7, 8].

In addition to association and GWAS studies, transcriptome analysis has been also performed in SLE patients, aimed at identifying new candidate genes. Sandrin-Garcia et al. [9] evaluated the expression profile of 4500 genes in patients with active and inactive SLE: a total of 156 genes were differentially expressed in patients and healthy controls, and 8 upregulated/downregulated genes were considered as possible candidates for disease susceptibility. Within them, *FYB* gene was downregulated in active and inactive SLE patients.

The *FYB* gene, located on chromosome 5 (5p13.1) with a coding region constituted by 20 exons covering 169.293 bases pairs, encodes an adaptor protein involved in the T cell signal transduction pathway. Engagement of antigen to the lymphocyte surface receptors triggers intracellular signaling cascades, resulting in T cell activation, differentiation and

acquisition of effectors function or apoptosis [10] and the adaptor proteins play a critical role in connecting those signals from cell surface receptors to distal signaling pathways [11].

The Fyb protein, also known as SLAP-130 (SLP-76-associated phosphoprotein of 130 kDa) or ADAP (Adhesion and Degranulation promoting Adaptor Protein), is expressed in T cells and myeloid cells [10], and is possibly involved in positive regulation of T cell activation and integrin-mediated adhesion [12] as well as IL-2 production [13]. Considering that the dysfunction in T cells is considered the starting point of SLE pathogenesis, the *FYB* gene, being expressed in T cells and implied in their positive regulation, and being downregulated in active and inactive SLE patients [9], could be a potential candidate gene for susceptibility to SLE.

In this study, we analyzed 10 tag SNPs, located at the coding region and 5' and 3' untranslated regions, covering the entire *FYB* gene, looking for an association with SLE in Southern Brazilian patients and healthy controls, stratified according to clinical features and ethnicity.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Controls

DNA samples from 143 patients (135 females and 8 males) aged between 17 and 67 years (mean 39.8 ± 11.9) followed-up at the Division of Clinical Immunology, School of Medicine at the Hospital of Ribeirão Preto (University of São Paulo, Brazil). SLE diagnosis was performed according to the criteria defined by the American College of Rheumatology Classification Criteria (ACR, 1997). Patients were classified as European- or African-derived according to individual phenotypic characteristics and ethnicity data of parents/grandparents following the skin color-based classification criteria adopted in Brazil [14,15]. In total, 113

individuals were classified as European-derived (79%) and 30 were classified as African-derived (21%).

The following clinical and laboratorial data regarding the SLE patients were collected (Table 1): photosensitivity, serositis (pleuritis, pericarditis), arthritis, cutaneous alterations (malar or discoid rashes, oral ulcers), neuropsychiatric disorder, nephritic disorder, antiphospholipid syndrome (APS), Raynaud phenomenon, hematological alterations (hemolytic anemia, leucopenia, lymphopenia, thrombocytopenia), immunological alterations (Anticardiolipin, Anti-Sm, Anti-RNP, Anti-Ro/SSA, Anti-La/SSB, and VDRL), presence of antinuclear antibodies (ANA), and presence of anti-double-strand DNA antibody (anti ds-DNA).

Genomic DNAs from 184 healthy controls (96 females, 88 males; mean age = 37.0 ± 11.3), from the same geographic area of SLE patients, without previous family history of autoimmune disorders were also obtained. All the controls were blood donors and have been previously genotyped for HLA haplotypes HLA-A, B, C, DR and DQ. The presence of any HLA risk haplotype was an exclusion criterion. In the controls group, 136 (74%) were European-derived and 48 African-derived (26%). Written informed consent was obtained from all individuals and the local Ethics Committee approved the protocol of this study (#2234/2007).

2.2. *FYB* Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral whole blood using a salting out procedure [16]. We selected 10 Tag SNPs in *FYB* coding and regulatory (5' and 3' untranslated, UTR) regions in order to cover the entire length of the gene (Figure 1). The Tag SNPs (rs6863066, rs1642515, rs36011681, rs35384751, rs34222014, rs35730995, rs379707,

rs404122, rs2161612 and rs358501) were selected crossing and merging data from SNPBrowserTM Software version 4.0 (Applied Biosystems) and International HapMap Project (www.hapmap.org) as well as the National Center of Biotechnology Information site (NCBI – www.ncbi.nih.gov/SNP/). The inclusion criteria for this selection were the coverage of a significant part of the gene and the occurrence in both YRI (Yoruba in Ibadan, Nigeria) and CEU (Utah residents with Northern and Western European ancestry) populations.

The selected SNPs are shown in supplementary table 1. SNPs genotyping was performed with fluorogenic allele specific probes (Taqman Probes, Life Technologies, Carlsbad, CA) using the ABI7500 Real Time PCR platform (Applied Biosystems, Foster City, CA).

2.3 Statistical Analysis

Allele and genotype frequencies in patients and controls were calculated by direct gene counting. Fisher's test was used to compare genotype and allele frequencies and to test their associations with clinical/laboratorial manifestations and ethnic group data. The odds ratio (ORs) and 95% confidence intervals (95% CI), and adherence to the Hardy-Weinberg Equilibrium were evaluated using the R 2.10.0 (<http://www.r-project.org/>) software. *FYB* haplotypes were computed using SNPstat (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>). Clinical and laboratorial features distribution was analyzed using the EpiInfo version 3.5.1 software (<http://www.cdc.gov/epiinfo/about.htm>).

3. Results

3.1. Association of *FYB* SNPs and susceptibility to SLE

We analyzed the distribution of 10 *FYB* SNPs, localized at the coding region and 5' and 3' UTR of the gene, in 143 SLE patients and 184 healthy controls. Allele and genotype

frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium with the exception of rs358501 T>C SNP in the controls ($p = 0.04$). Significant differences were observed when comparing the allele and genotype frequencies of patients and controls for the rs6863066 C>T and rs358501 T>C SNPs (Table 2). No significant difference was found for the other SNPs analyzed (Supplementary table 2).

The T allele of rs6863066 C>T SNP was more frequent in patients (37.1%) than in controls (23.4%) and the presence of the T allele associated with a possible increased risk for SLE development (OR = 1.93, CI = 1.35-2.75, $p = 0.0002$). The homozygous T/T genotype frequencies were significantly different between patients (11.2%) and controls (4.9%) (OR = 3.56, CI = 1.37 - 9.79, $p = 0.006$), and a similar difference was also observed for heterozygous C/T genotype (51.7% in patients and 37% in controls, $p = 0.001$) indicating a probable association with an increased risk for SLE (OR = 2.19, CI = 1.34 - 3.60). When comparing a dominant and recessive genetic model, we observed that the effect of the T allele was more consistent with a dominant genetic model (T/T + C/T vs. C/C genotypes, OR = 2.35, $p = 0.0002$) than a recessive one (T/T vs. C/T + C/C, OR = 2.44, $p = 0.04$).

The frequency of rs358501 C allele was increased in patients (24.8%) than controls (16.3%) and associated with a possible augmented risk of developing SLE (OR = 1.69, CI = 1.13 - 2.54, $p = 0.008$). The C/C genotype was more frequent in patients (4.9%) than in controls (0.5%), thus also the presence of C/C genotype similarly associated with an increased susceptibility to SLE (OR = 10.96, CI = 1.36 - 501.81, $p = 0.008$).

We then stratified patients and healthy controls according to ethnicity (European or African-derived). Allele and genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium even after stratification (Supplementary table 3).

The rs6863066 T allele showed higher frequency in European-derived patients (35.4%) than controls (21.3%), indicating an association with risk to develop SLE in this ethnicity (OR = 2.02, CI = 1.36 – 3.01, $p = 0.0005$). Both C/T and T/T genotypes frequencies were also significantly higher in European-derived patients (53.1% and 8.8%, respectively) than in European-derived controls (32.4% and 5.1%, respectively) ($p = 0.0002$ and $p = 0.004$; OR = 2.7 and OR = 2.8, respectively). When comparing rs6863066 alleles and genotypes frequencies in the African derived-group, only the homozygous T/T genotype showed an associated with SLE (OR= 6.6, CI = 1.13 - 38.61, $p = 0.02$) (Table 3).

The rs358501 C allele was significantly more frequent in European-derived patients when compared to European-derived controls (23% and 15.4%, $p = 0.03$), suggesting susceptibility to SLE (OR=1.64). No significant differences were observed when comparing genotypes frequencies between European-derived patients and controls for this SNP. The rs358501 C/C genotype was significantly ($p=0.01$) more frequent in African-derived patients (13.3%) than in African-derived controls, where it was never observed. (Table 3).

No significant differences were found for 10 tested SNPs when comparing European-derived patients with African-derived patients or European-derived controls with African-derived controls (Supplementary table 4).

When we computed *FYB* haplotypes for the two polymorphisms associated with SLE (Table 4), we found that two haplotypes were significantly associated with SLE: T-T and T-C haplotypes (rs6863066 and rs358501, respectively; $D' = 0.21$) associated with predisposition to disease development (OR =2.06, CI = 1.31 – 3.26, $p = 0.002$ and OR = 2.93, CI = 1.53 – 5.63, $p = 0.001$). After haplotypes stratification according to ethnicity, we again observed an association between T-T and T-C haplotypes and susceptibility to SLE for European-derived

patients when compared to European-derived controls (OR = 2.34, CI = 1.37 - 3.99, $p = 0.002$; OR = 2.64, CI = 1.17 - 5.96, $p = 0.02$). Moreover the T-C haplotype, but not the T-T, was significantly associated with SLE susceptibility also when comparing African-derived patients with African-derived controls (OR = 4.29, CI = 1.10 - 16.77, $p = 0.04$).

3.2. Association between *FYB* SNPs and clinical/laboratorial manifestations in SLE patients

Finally we assessed the possible association between *FYB* gene SNPs and the occurrence of patients' clinical manifestations. The G allele and G/G genotype of rs2161612 SNP showed an association with hematological alterations (OR = 0.52, CI = 0.3 - 0.9, $p = 0.02$; OR = 0.13, CI = 0.01 - 0.72, $p = 0.008$) and the rs379707 A/C genotype with anti-DNA antibodies (anti ds-DNA) (OR = 4.69, CI = 1.25 - 26.50, $p = 0.01$) (Table 5). Both these associations, were independent from ethnicity (data not shown).

4. Discussion

In this study we identified an association between SNPs in the *FYB* gene, chosen due to previous evidence of its differential expression in SLE patients [9], and susceptibility to SLE in patients from Southern Brazil.

Two out of the 10 tested SNPs, namely rs6863066 SNP (T allele) and rs358501 SNP (C allele), were associated with susceptibility to the disease (OR = 1.93 and OR = 1.69 respectively). An association with SLE was also observed for the rs6863066-rs358501 T-T and T-C haplotypes (OR = 2.06 and OR = 2.93 respectively).

After stratification for ethnicity, the rs6863066 T allele and rs358501 C allele were still associated with susceptibility to develop SLE in European (OR = 2.02, OR = 1.64, respectively) but not in African-derived patients. The allelic frequencies of the rs358501 SNP

we observed in Europeans and Africans-derived patients and controls were in agreement with those reported by Hapmap (T = 0.8; C = 0.2, <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). For the 6863066 SNP instead, while according to Hapmap the C allele should be more common in Europeans (C = 0.8, T = 0.2) and T allele in African-derived (C = 0.3, T = 0.7), we observed that the C allele was similarly the most frequent in both populations (C = 0.8; T = 0.2). The T-C haplotype was associated with susceptibility to SLE in both European and African-derived patients (OR = 2.64 and OR = 4.29, respectively) while the T-T haplotype was associated only in European-derived patients (OR = 2.34). However, we are aware that, after stratification for ethnicity, the sample size is small especially for the African-derived population, and thus our findings have to be interpreted with caution.

Although the functional effect of rs6863066 and rs358501 SNPs on the protein encoded by the *FYB* gene is still unknown, we can hypothesize that these polymorphisms located at the 5' (rs6863066) and 3' (rs358501) region may affect the mRNA synthesis or stability, and consequently protein expression.

We firstly verified *in silico* the hypothesis of an involvement of the two SNPs as target of miRNA, using the PolymiRTS Database 2.0 (<http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/>) and miRabela (http://www.mirz.unibas.ch/cgi/pred_miRNA_genes.cgi), but none of them was a target for miRNA. Since the rs6863066 SNP maps in the 5'UTR of the gene, a region usually involved in transcription regulation, we also verified if this SNP could affect the binding of any transcription factor. According to the TF-SEARCH program (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>), in presence of the rs6863066 C allele, there is a binding site for the MZF1 factor, that is not present when the C is replaced by the T allele. If this SNP interferes with the binding *in vivo*, remains to be further elucidated.

Since Fyb protein participates in T cell signal transduction pathway and considered that dysfunction in T cells is the starting point of the SLE pathogenesis, any protein alteration or defective production could be involved in SLE development. Fyb protein alteration may impair the cascade of lymphocytes T activation, inducing the production of autoreactive T lymphocytes and autoantibodies, increasing the formation and deposition of immune complexes. An abnormal deposition of immune complexes will trigger an inflammatory response resulting in possible development of SLE and the appearance of clinical manifestations. However, the functional effect of SLE associated SNPs on the function of Fyb protein remains to be elucidated experimentally.

When stratifying *FYB* SNPs according to patient's clinical manifestations, we observed an association between the rs379707 A/C genotype and presence of anti-DNA antibody (OR = 4.69). The presence of this SNP in exon 15 of *FYB* gene cause the substitution of a phenylalanine to a valine aminoacid, which could cause an impaired function of the Fyb protein, leading to anti-DNA antibodies production. The role of these antibodies in the pathogenesis of the disease has not been disclosed yet, however it has been suggested that, when directed to cellular components, such as DNA, they could have a pathogenic effect, since high levels of self-anti-DNA antibody are associated with exacerbation of the disease [17]. These antibodies participate in the deposition of immune complexes, causing activation of the complement system and increasing the inflammatory activity [18].

The rs2161612 G allele and G/G genotype showed instead a protective effect towards the development of hematological disorders (OR = 0.52 and OR = 0.13, respectively) in SLE patients. During the course of the disease, more than half of SLE patients present hematological disorders, such as leukopenia and lymphopenia and less than 10% are characterized by severe thrombocytopenia. Hemolytic anemia is a diagnostic criterion

indicating inflammatory activity of disease [19]. Our hypothesis is that SLE patients carrying the G allele and G/G genotype could be protected from excessive inflammation, thus presenting only moderate or no hematological disorders at all.

When considering our results, we have to acknowledge that while the patients group contains mainly diseased women with SLE (which nicely fit more or less the ratio observed between men and women with SLE in other studies), our control group contains a 1:1 men/women ratio. Since there seems to be a women linked component in SLE we wanted to exclude that the significant associations we reported could be due to the different male/female ratio in patients and controls, even if *FYB* is not X-chromosome linked. When stratifying patients and controls according to gender, the association for *FYB* SNPs remained statistically significant in female: so, even if a female component accounting for SLE susceptibility may be present, the association we reported between *FYB* SNPs and SLE is not a spurious one. No statistically significant differences were seen comparing male patients and male controls, but this is probably due to the small number of male patients available (only 8). Moreover, when comparing male controls with female controls, no statistically significant differences were seen, indicating that *FYB* SNPs frequencies are not gender dependent.

To the best of our knowledge, this is the first study involving *FYB* gene SNPs and SLE susceptibility and our results provide evidence of the involvement of the *FYB* gene in SLE susceptibility. Our data are supported by previous finding of differential gene expression analysis, in which *FYB* gene has been demonstrated to be downregulated in SLE patients, suggesting its involvement in the etiology of the disease. However, we are aware that the functional effect of the investigated SNPs is unknown and that new association and replica studies in other populations will be needed to confirm the involvement of *FYB* gene in SLE susceptibility.

Acknowledgements

We acknowledge FACEPE (APQ-0087-2.02/08) and FACEPE/CNPq (DCR-0089-2.02/08) and CNPq (CNPq 471942/2010-3) for the financial support. The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTISFIOCRUZ for the use of its facilities. SC is recipient of a fellowship grant from the European Project “Talents for an International House” within the framework of the 7th Research & Development Framework Programme PEOPLE – Marie Curie Actions – COFUND (Co-Funding of Regional, National and International Programmes).

Conflicts of Interest

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

References

- [1] Kyttaris VC. Systemic lupus erythematosus: from genes to organ damage. *Methods Mol Biol.* 2010;662:265-83.
- [2] Crispín JC, Liossis SN, Kis-Toth K, Lieberman LA, Kyttaris VC, Juang YT et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med.* 2010 Feb;16(2):47-57.
- [3] Vyse TJ, Kotzin BL. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:261-92.
- [4] Criswell LA. The genetic contribution to systemic lupus erythematosus. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2008; 66:176–83.
- [5] Harley JB, Moser KL, Gaffney PM, Behrens TW. The genetics of human systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol.* 1998; 10:690–6.
- [6] Tan FK, Arnett FC. The genetics of lupus. *Curr Opin Rheumatol.* 1998; 10:399–408.
- [7] Taylor KE, Chung SA, Graham RR, Ortmann WA, Lee AT et al. Risk alleles for Systemic Lupus Erythematosus in a large case- control collection and associations with clinical subphenotypes. *PLoS Genet.* 2011; 7(2).
- [8] Ardoin SP, Pisetsky DS. Developments in the scientific understanding of lupus. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(5):218.
- [9] Sandrin-Garcia P, Junta CM, Fachin AL, Mello SS, Baião AMT, Rassi DM et al. Shared and unique gene expression in systemic lupus erythematosus depending on disease activity. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Sep;1173:493-500.
- [10] Griffiths EK, Krawczyk C, Kong YY, Raab M, Hyduk SJ, Bouchard D et al. Positive regulation of T cell activation and integrin adhesion by the adapter Fyb/Slap. *Science.* 2001 Sep 21;293(5538):2260-3.
- [11] Peterson EJ, Woods ML, Dmowski SA, Derimanov G, Jordan MS, Wu JN et al. Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. *Science.* 2001 Sep 21;293(5538):2263-5.
- [12] Wang H, Rudd CE. SKAP-55, SKAP-55-related and ADAP adaptors modulate integrin-mediated immune-cell adhesion. *Trends Cell Biol.* 2008 Oct;18(10):486-93.
- [13] da Silva AJ, Li Z, de Vera C, Canto E, Findell P, Rudd CE. Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jul 8;94(14):7493-8.

- [14] Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, Bortolini MC, Chies JA. Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res.* 2006 Mar;39(3):321-5.
- [15] Veit TD, Cordero EA, Mucenic T, Monticelo OA, Brenol JC, Xavier RM et al. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2009 Apr;18(5):424-30.
- [16] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning - A laboratory Manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- [17] Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum.* 2004 Oct;34(2):501-37.
- [18] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology.* 6th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
- [19] Assis MR, Baaklini CE. Lúpus Eritematoso Sistêmico. *Revista Brasileira de Medicina.* 2009 Set; 66(9):274-285.

TABLES

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

Clinical/laboratorial characteristics	
	n (%)
Photosensitivity	42 (29.4%)
Serositis	36 (25.2%)
Arthritis	61 (42.6%)
Cutaneous alterations	84 (58.7%)
Neuropsychiatric disorder	29 (20.3%)
Nephritic disorder	80 (55.9%)
Hematological alterations	80 (55.9%)
Immunological alterations	87 (60.8%)
Antinuclear Factor positive (FAN)	115 (80.4%)
Antibody anti DNA (anti ds-DNA)	28 (19.6%)
Antiohospholipid syndrome (APS)	30 (21%)
Sjögren syndrome	4 (2.8%)
Raynaud phenomenon	7 (4.9%)
Hypertension Arterial Syndrome	47 (32.9%)

Table 2. Allele and genotype frequencies of *FYB* rs6863066 and rs358501 SNPs in SLE patients and healthy controls.

<i>FYB</i> SNPs	Patients n=143 n (%)	Controls n=184 n (%)	OR, CI and <i>p</i>
rs6863066			
Alleles			
C	180 (62.9)	282 (76.6)	OR = 1
T	106 (37.1)	86 (23.4)	OR = 1.93, CI = 1.35-2.75, <i>p</i> = 0.0002^a
Genotypes			
C/C	53 (37.1)	107 (58.1)	OR = 1
C/T	74 (51.7)	68 (37)	OR = 2.19, CI = 1.34 - 3.60, <i>p</i> = 0.001^a
T/T	16 (11.2)	9 (4.9)	OR = 3.56, CI = 1.37 - 9.79, <i>p</i> = 0.006^a
HWE <i>p</i> = 0.19 HWE <i>p</i> = 0.66			
rs358501			
Alleles			
T	215 (75.2)	308 (83.7)	OR = 1
C	71 (24.8)	60 (16.3)	OR = 1.69, CI = 1.13-2.54, <i>p</i> = 0.008^a
Genotypes			
T/T	79 (55.2)	125 (68)	OR = 1
T/C	57 (39.9)	58 (31.5)	OR = 1.55, CI = 0.95 - 2.53, <i>p</i> = 0.08
C/C	7 (4.9)	1 (0.5)	OR = 10.96, CI = 1.36 - 501.81, <i>p</i> = 0.008^a
HWE <i>p</i> = 0.41 HWE <i>p</i> = 0.04			
OR = Odds Ratio, CI = 95% Confidence Interval, HWE = Hardy-Weinberg Equilibrium,			
^a Statistically significant p-value.			

Table 3. Allele and genotype frequencies of *FYB* rs6863066 and rs358501 SNPs in SLE patients and healthy controls after stratification for ethnicity.

EUROPEAN-DERIVED				AFRICAN-DERIVED		
	Patients n=113 n (%)	Controls n=136 n (%)	OR, CI and <i>p</i>	Patients n=30 n (%)	Controls n=48 n (%)	OR, CI and <i>p</i>
rs6863066						
Alleles						
C	146 (64.6)	214 (78.7)	OR = 1	34 (56.7)	68 (70.8)	OR = 1
T	80 (35.4)	58 (21.3)	OR = 2.02, CI = 1.36 - 3.01, <i>p</i> = 0.0005^a	26 (43.3)	28 (29.2)	OR = 1.86, CI = 0.95 - 3.64, <i>p</i> = 0.07
Genotypes						
C/C	43 (38.1)	85 (62.5)	OR = 1	10 (33.3)	22 (45.8)	OR = 1
C/T	60 (53.1)	44 (32.4)	OR = 2.7, CI = 1.58 - 4.6, <i>p</i> = 0.0002^a	14 (46.7)	24 (50)	OR = 1.28, CI = 0.47 - 3.48, <i>p</i> = 0.38
T/T	10 (8.8)	7 (5.1)	OR = 2.8, CI = 1 - 7.94, <i>p</i> = 0.004^a	6 (20)	2 (4.2)	OR = 6.6, CI = 1.13- 38.61, <i>p</i> = 0.02^a
	HWE <i>p</i> = 0.09	HWE <i>p</i> = 0.7		HWE <i>p</i> = 0.8	HWE <i>p</i> = 0.1	
rs358501						
Alleles						
T	174 (77)	230 (84.6)	OR = 1	41 (68.3)	78 (81.3)	OR = 1
C	52 (23)	42 (15.4)	OR = 1.64, CI = 1.04-2.57, <i>p</i> = 0.03^a	19 (31.7)	18 (18.7)	OR = 2.01, CI = 0.95 - 4.24, <i>p</i> = 0.06
Genotypes						
T/T	64 (56.6)	95 (69.9)	OR = 1	15 (50)	30 (62.5)	OR = 1
C/T	46 (40.7)	40 (29.4)	OR=1.7, CI = 1.01- 2.9, <i>p</i> = 0.05	11 (36.7)	18 (37.5)	OR = 1.22, CI = 0.46 - 3.23, <i>p</i> = 0.47
C/C	3 (2.7)	1 (0.7)	OR=4.45, CI =0.45-43.77, <i>p</i> = 0.08	4 (13.3)	0 (0)	OR = Inf, CI = 1.14 - Inf, <i>p</i> = 0.01^a
	HWE <i>p</i> = 0.11	HWE <i>p</i> = 0.14		HWE <i>p</i> = 0.4	HWE <i>p</i> = 0.1	
OR = Odds Ratio, CI = 95% Confidence Interval, HWE = Hardy-Weinberg Equilibrium, ^a Statistically significant p-value.						

Table 4. Haplotypes frequencies of *FYB* rs6863066 and rs358501 SNPs in SLE patients and healthy controls stratified or not for ethnicity.

Haplotypes	Patients		Controls		OR, CI and <i>p</i>
rs6863066- rs358501	N	(%)	N	(%)	
C-T	143	49.97	244	66.41	OR = 1
T-T	72	25.21	64	17.28	OR = 2.06, CI = 1.31 - 3.26, <i>p</i> = 0.002^a
C-C	37	12.97	38	10.22	OR = 1.86, CI = 0.99 - 3.49, <i>p</i> = 0.05
T-C	34	11.85	22	6.09	OR = 2.93, CI = 1.53 - 5.63, <i>p</i> = 0.001^a
European-derived					
C-T	115	50.77	188	69.12	OR = 1
T-T	59	26.22	42	15.44	OR = 2.34, CI = 1.37 - 3.99, <i>p</i> = 0.002^a
C-C	31	13.83	26	9.56	OR = 2.0, CI = 0.99 - 4.02, <i>p</i> = 0.05
T-C	21	9.18	16	5.88	OR = 2.64, CI = 1.17 - 5.96, <i>p</i> = 0.02^a
African-derived					
C-T	26	43.12	52	54.52	OR = 1
T-T	15	25.22	26	26.73	OR = 1.75, CI = 0.69 - 4.43, <i>p</i> = 0.24
C-C	8	13.55	16	16.31	OR = 1.63, CI = 0.36 - 7.40, <i>p</i> = 0.53
T-C	11	18.11	2	2.44	OR = 4.29, CI = 1.10 - 16.77, <i>p</i> = 0.04^a
OR = Odds Ratio, CI = 95% Confidence Interval, ^a Statistically significant p-value.					

Supplementary Table 2. Allele and genotype frequencies of *FYB* SNPs analyzed in SLE patients and healthy controls.

<i>FYB</i> SNPs	Patients n = 143 n (%)	Controls n = 184 n (%)	OR, CI and <i>p</i>
rs2161612			
Alleles			
A	207 (72.4)	253 (68.7)	OR = 1
G	79 (27.6)	115 (31.3)	OR = 0.84, CI = 0.58-1.19, <i>p</i> = 0.34
Genotypes			
A/A	75 (52.4)	88 (47.8)	OR = 1
A/G	57 (39.9)	77 (41.9)	OR = 0.89, CI = 0.53 - 1.41, <i>p</i> = 0.56
G/G	11 (7.7)	19 (10.3)	OR = 0.68, CI = 0.27 - 1.61, <i>p</i> = 0.43
	HWE <i>p</i> = 0.97	HWE <i>p</i> = 0.72	
rs404122			
Alleles			
T	196 (68.5)	271 (73.6)	OR = 1
A	90 (31.5)	97 (26.4)	OR = 1.28, CI = 0.9- 1.83, <i>p</i> = 0.16
Genotypes			
T/T	67 (46.8)	104 (56.5)	OR = 1
T/A	62 (43.4)	63 (34.2)	OR = 1.53, CI = 0.93 - 2.5, <i>p</i> = 0.08
A/A	14 (9.8)	17 (9.3)	OR = 1.28, CI = 0.54 – 2.96, <i>p</i> = 0.55
	HWE <i>p</i> = 0.9	HWE <i>p</i> = 0.11	
rs379707			
Alleles			
A	155 (54.2)	207 (56.2)	OR = 1
C	131 (45.8)	161 (43.8)	OR = 1.08, CI = 0.79- 1.5, <i>p</i> = 0.63
Genotypes			
A/A	42 (29.4)	58 (31.5)	OR = 1
A/C	71 (49.6)	91 (49.5)	OR = 1.07, CI = 0.63 – 1.84, <i>p</i> = 0.8
C/C	30 (21)	35 (19)	OR = 1.18, CI = 0.6 – 2.33, <i>p</i> = 0.63
	HWE <i>p</i> = 0.9	HWE <i>p</i> = 0.9	
rs35730995			
Alleles			
G	240 (83.9)	290 (78.8)	OR = 1

A	46 (16.1)	78 (21.2)	OR = 0.71, CI = 0.46- 1.1, $p = 0.11$
Genotypes			
G/G	101 (70.6)	112 (60.9)	OR = 1
A/G	38 (26.6)	66 (35.9)	OR = 0.64, CI = 0.38 – 1.06, $p = 0.07$
A/A	4 (2.8)	6 (3.2)	OR = 0.74, CI = 0.15 – 3.22, $p = 0.75$
	HWE $p = 0.9$	HWE $p = 0.3$	
rs34222014			
Alleles			
C	284 (99.3)	365 (99.2)	OR = 1
T	2 (0.7)	3 (0.8)	OR = 0.86, CI = 0.07 – 7.53, $p = 1$
Genotypes			
C/C	141 (98.6)	181 (98.4)	OR = 1
C/T	2 (1.4)	3 (1.6)	OR = 0.86, CI = 0.07 – 7.58, $p = 1$
T/T	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 – Inf, $p = 1$
	HWE $p = 0.9$	HWE $p = 0.9$	
rs35384751			
Alleles			
G	283 (98.9)	360 (97.8)	OR = 1
T	3 (1.1)	8 (2.2)	OR = 0.48, CI = 0.08- 2.01, $p = 0.36$
Genotypes			
G/G	140 (97.9)	176 (95.6)	OR = 1
G/T	3 (2.1)	8 (4.4)	OR = 0.47, CI = 0.08 – 2.01, $p = 0.35$
T/T	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 – Inf, $p = 1$
	HWE $p = 0.9$	HWE $p = 0.8$	
rs36011681			
Alleles			
C	285 (99.6)	367 (99.7)	OR = 1
A	1 (0.4)	1 (0.3)	OR = 1.29, CI = 0.02- 101.3, $p = 1$
Genotypes			
C/C	142 (99.3)	183 (99.5)	OR = 1
C/A	1 (0.7)	1 (0.5)	OR = 1.29, CI = 0.02 – 101.7, $p = 1$
A/A	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 – Inf, $p = 1$
	HWE $p = 0.9$	HWE $p = 0.9$	
rs1642515			
Alleles			
G	277 (96.8)	357 (97)	OR = 1

A	9 (3.2)	11 (3)	OR = 1.05, CI = 0.38 – 2.84, $p = 1$
---	---------	--------	--------------------------------------

Genotypes

G/G	134 (93.7)	173 (94)	OR = 1
G/A	9 (6.3)	11 (6)	OR = 1.06, CI = 0.37 – 2.89, $p = 1$
A/A	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 – Inf, $p = 1$
	HWE $p = 0.7$	HWE $p = 0.7$	

OR = Odds Ratio, CI = 95% Confidence Interval, p = p-value, HWE = Hardy-Weinberg Equilibrium.

Supplementary Table 3. Allele and genotype frequencies of *FYB* SNPs in SLE patients and healthy controls after stratification for ethnicity.

EUROPEAN-DERIVED				AFRICAN-DERIVED		
	Patients	Controls	OR, CI and <i>p</i>	Patients	Controls	OR, CI and <i>p</i>
	n = 113	n = 136		n = 30	n = 48	
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
rs2161612						
Alleles						
A	164 (72.6)	181 (66.5)	OR = 1	43 (71.7)	72 (75)	OR = 1
G	62 (27.4)	91 (33.5)	OR = 0.8, CI = 0.5-1.1, <i>p</i> = 0.15	17 (28.3)	24 (25)	OR = 1.2, CI = 0.6-2.4, <i>p</i> = 0.65
Genotypes						
A/A	59 (52.2)	61 (44.8)	OR = 1	16 (53.3)	27 (56.3)	OR = 1
A/G	46 (40.7)	59 (43.4)	OR = 0.8, CI = 0.48-1.4, <i>p</i> = 0.37	11 (36.7)	18 (37.5)	OR = 1.03, CI = 0.39-2.73, <i>p</i> = 0.86
G/G	8 (7.1)	16 (11.8)	OR = 0.5, CI = 0.2–1.3, <i>p</i> = 0.15	3 (10)	3 (6.2)	OR = 1.7, CI = 0.3–9.4, <i>p</i> = 0.54
	HWE	HWE		HWE	HWE	
	<i>p</i> = 0.81	<i>p</i> = 0.76		<i>p</i> = 0.59	<i>p</i> = 0.99	
rs404122						
Alleles						
T	158 (69.9)	203 (74.6)	OR = 1	38 (63.3)	68 (70.8)	OR = 1
A	68 (30.1)	69 (25.4)	OR = 1.3, CI = 0.8-1.9, <i>p</i> = 0.24	22 (36.7)	28 (29.2)	OR = 1.4, CI = 0.71-2.79, <i>p</i> = 0.33
Genotypes						
T/T	54 (47.8)	80 (58.8)	OR = 1	13 (43.3)	24 (50)	OR = 1
T/A	50 (44.2)	43 (31.6)	OR = 1.7, CI = 1.01–2.9, <i>p</i> = 0.06	12 (40)	20 (41.7)	OR = 1.11, CI = 0.41-2.96, <i>p</i> = 0.67
A/A	9 (8)	13 (9.6)	OR = 1.02, CI = 0.4–2.6, <i>p</i> = 0.2	5 (16.7)	4 (8.3)	OR = 2.3, CI = 0.53–10.1, <i>p</i> = 0.25

Alleles

C	225 (99.6)	269 (98.9)	OR = 1	59 (98.3)	96 (100)	OR = 1
T	1 (0.4)	3 (1.1)	OR = 0.4, CI = 0.04-3.9, $p = 0.41$	1 (1.7)	0 (0)	OR = Inf, CI = 0.04-Inf, $p = 0.38$

Genotypes

C/C	112 (99.1)	133 (97.8)	OR = 1	29 (96.7)	48 (100)	OR = 1
C/T	1 (0.9)	3 (2.2)	OR = 0.4, CI = 0.04-3.9, $p = 0.4$	1 (3.3)	0 (0)	OR = Inf, CI = 0.04-Inf, $p = 0.38$
T/T	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 – Inf, $p = 1$	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 – Inf, $p = 1$
	HWE	HWE		HWE	HWE	
	$p = 0.96$	$p = 0.89$		$p = 0.92$	$p = \text{ND}$	

rs35384751**Alleles**

G	224 (99.1)	268 (98.5)	OR = 1	59 (98.3)	92 (95.8)	OR = 1
T	2 (0.9)	4 (1.5)	OR = 0.59, CI = 0.1-3.3, $p = 0.55$	1 (1.7)	4 (4.2)	OR = 0.39, CI = 0.04-3.6, $p = 0.38$

Genotypes

G/G	111 (98.2)	132 (97.1)	OR = 1	29 (96.7)	44 (91.7)	OR = 1
G/T	2 (1.8)	4 (2.9)	OR = 0.6, CI = 0.1-3.3, $p = 0.55$	1 (3.3)	4 (8.3)	OR = 0.38, CI = 0.007-4.13, $p = 0.64$
T/T	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 – Inf, $p = 1$	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 – Inf, $p = 1$
	HWE	HWE		HWE	HWE	
	$p = 0.92$	$p = 0.86$		$p = 0.93$	$p = 0.76$	

rs36011681**Alleles**

C	225 (99.6)	271 (99.6)	OR = 1	60 (100)	96 (100)	OR = 1
A	1 (0.4)	1 (0.4)	OR = 1.2, CI = 0.1-19.3, $p = 0.89$	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 – Inf, $p = 1$

Genotypes

Supplementary Table 4. Analysis of allele and genotype frequencies of *FYB* SNPs according to ethnicity in both patients and controls.

PATIENTS				CONTROLS		
	European derived n = 113 n (%)	African derived n = 30 n (%)	OR, CI and <i>p</i>	European derived n = 136 n (%)	African derived n = 48 n (%)	OR, CI and <i>p</i>
rs358501						
Alleles						
T	174 (77)	41(68.3)	OR = 1	230 (84.6)	78 (81.3)	OR = 1
C	52 (23)	19 (31.7)	OR = 0.6, CI = 0.3–1.3, <i>p</i> = 0.18	42 (15.4)	18 (18.7)	OR = 0.79, CI = 0.42-1.55, <i>p</i> = 0.52
Genotypes						
T/T	64 (56.6)	15 (50)	OR = 1	95 (69.9)	30 (62.5)	OR = 1
T/C	46 (40.7)	11 (36.7)	OR = 0.98, CI = 0.4–2.6, <i>p</i> = 1	40 (29.4)	18 (37.5)	OR = 0.70, CI = 0.33 - 1.50, <i>p</i> = 0.36
C/C	3 (2.7)	4 (13.3)	OR = 0.18, CI = 0.02–1.2, <i>p</i> = 0.5	1 (0.7)	0 (0)	OR = Inf, CI = 0.008 – Inf, <i>p</i> = 1
	HWE <i>p</i> = 0.1	HWE <i>p</i> = 0.4		HWE <i>p</i> = 0.14	HWE <i>p</i> = 0.1	
rs2161612						
Alleles						
A	164 (72.6)	43 (71.7)	OR = 1	181(66.5)	72 (75)	OR = 1
G	62 (27.4)	17 (28.3)	OR = 0.96, CI = 0.5-1.8, <i>p</i> = 0.9	91 (33.5)	24 (25)	OR = 1.5, CI = 0.9-2.5, <i>p</i> = 0.12
Genotypes						
A/A	59 (52.2)	16 (53.3)	OR = 1	61 (44.8)	27 (56.3)	OR = 1
A/G	46 (40.7)	11 (36.7)	OR = 1.1, CI = 0.48-2.7, <i>p</i> = 0.75	59 (43.4)	18 (37.5)	OR = 1.5, CI = 0.7-2.9, <i>p</i> = 0.26
G/G	8 (7.1)	3 (10)	OR = 0.7, CI = 0.2–3.04, <i>p</i> = 0.6	16 (11.8)	3 (6.2)	OR = 2.4, CI = 0.6–8.8, <i>p</i> = 0.16

Alleles

G	186 (82.3)	54 (90)	OR = 1	218 (80.1)	72 (75)	OR = 1
A	40 (17.7)	6 (10)	OR = 1.9, CI = 0.8-4.8, $p = 0.15$	54 (19.9)	24 (25)	OR = 0.74, CI = 0.43-1.3, $p = 0.3$

Genotypes

G/G	77 (68.2)	24 (80)	OR = 1	87 (64)	25 (52.1)	OR = 1
G/A	32 (28.3)	6 (20)	OR = 1.6, CI = 0.5-5.4, $p = 0.36$	44 (32.3)	22 (45.8)	OR = 0.57, CI = 0.29-1.13, $p = 0.11$
A/A	4 (3.5)	0 (0)	OR = Inf, CI = 0.2-Inf, $p = 0.6$	5 (3.7)	1 (2.1)	OR = 1.44, CI = 0.16-12.87, $p = 0.29$
HWE	HWE			HWE	HWE	
$p = 0.77$	$p = 0.54$			$p = 0.84$	$p = 0.12$	

rs34222014**Alleles**

C	225 (99.6)	59 (98.3)	OR = 1	269 (98.9)	96 (100)	OR = 1
T	1 (0.4)	1 (1.7)	OR = 0.3, CI = 0.02-4.3, $p = 0.31$	3 (1.1)	0 (0)	OR = Inf, CI = 0.04-Inf, $p = 0.38$

Genotypes

C/C	112 (99.1)	29 (96.7)	OR = 1	133 (97.8)	48 (100)	OR = 1
C/T	1 (0.9)	1 (3.3)	OR = 0.3, CI = 0.02-4.3, $p = 0.37$	3 (2.2)	0 (0)	OR = Inf, CI = 0.04-Inf, $p = 0.38$
T/T	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 - Inf, $p = 1$	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 - Inf, $p = 1$
HWE	HWE			HWE	HWE	
$p = 0.96$	$p = 0.92$			$p = 0.89$	$p = \text{ND}$	

rs35384751**Alleles**

G	224 (99.1)	59 (98.3)	OR = 1	268 (98.5)	92 (95.8)	OR = 1
T	2 (0.9)	1 (1.7)	OR = 0.53, CI = 0.05-5.9, $p = 0.6$	4 (1.5)	4 (4.2)	OR = 0.34, CI = 0.06-1.88, $p = 0.21$

Genotypes

G/G	111 (98.2)	29 (96.7)	OR = 1	132 (97.1)	44 (91.7)	OR = 1
G/T	2 (1.8)	1 (3.3)	OR = 0.5, CI = 0.05-5.9, $p = 0.59$	4 (2.9)	4 (8.3)	OR = 0.33, CI = 0.06–1.88, $p = 0.20$
T/T	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 – Inf, $p = 1$	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 – Inf, $p = 1$
	HWE	HWE		HWE	HWE	
	$p = 0.92$	$p = 0.92$		$p = 0.86$	$p = 0.76$	

rs36011681**Alleles**

C	225 (99.6)	60 (100)	OR = 1	271 (99.6)	96 (100)	OR = 1
A	1 (0.4)	0 (0)	OR = Inf, CI = 0.01- Inf, $p = 1$	1 (0.4)	0 (0)	OR = Inf, CI = 0.009 – Inf, $p = 1$

Genotypes

C/C	112 (99.1)	30 (100)	OR = 1	135 (99.3)	48 (0)	OR = 1
C/A	1 (0.9)	0 (0.7)	OR = Inf, CI = 0.01–Inf, $p = 1$	1 (0.7)	0 (0)	OR = Inf, CI = 0.009 – Inf, $p = 1$
A/A	0 (0)	0 (10.9)	OR = 0, CI = 0 – Inf, $p = 1$	0 (10.9)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 – Inf, $p = 1$
	HWE	HWE		HWE	HWE	
	$p = 0.96$	$p = \text{ND}$		$p = 0.97$	$p = \text{ND}$	

rs1642515**Alleles**

G	219 (96.9)	58 (96.7)	OR = 1	264 (97.1)	93 (96.9)	OR = 1
A	7 (3.1)	2 (3.3)	OR = 0.9, CI = 0.2-4.6, $p = 0.92$	8 (2.9)	3 (3.1)	OR = 0.93, CI = 0.21-5.6, $p = 1$

Genotypes

G/G	106 (93.8)	28 (93.3)	OR = 1	128 (94.1)	45 (93.7)	OR = 1
G/A	7 (6.2)	2 (6.7)	OR = 0.9, CI = 0.2-9.6, $p = 1$	8 (5.9)	3 (6.3)	OR = 0.94, CI = 0.21-5.72, $p = 1$
A/A	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 – Inf, $p = 1$	0 (0)	0 (0)	OR = 0, CI = 0 – Inf, $p = 1$
	HWE	HWE		HWE	HWE	

ANEXO B – Aprovação 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.