

**Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Genética**

**Helker Albuquerque Macedo da Silva**

**POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA EM GENES DE  
INTERLEUCINAS NO LÚPUS ERITEMATOSO**

**Recife  
2014**

**Helker Albuquerque Macedo da Silva**

**POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA EM GENES DE  
INTERLEUCINAS NO LÚPUS ERITEMATOSO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Genética da Universidade Federal de  
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para  
obtenção do título de Doutor em Genética.

**Orientador:** Dr<sup>a</sup> Maria Tereza Cartaxo Muniz

**Coorientador:** Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

**Recife**

**2014**

**Helker Albuquerque Macedo da Silva**

**Polimorfismos de base única em genes de interleucinas no Lúpus  
Eritematoso**

**Aprovado em 13 / 03 / 2014**

**Banca Examinadora:**

---

**Dr<sup>a</sup>. Maria Tereza Cartaxo Muniz  
Universidade de Pernambuco**

---

**Dr<sup>a</sup>. Maria de Mascena Diniz Maia  
Universidade Federal Rural de Pernambuco**

---

**Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia de Moura  
Universidade de Pernambuco**

---

**Dr<sup>a</sup>. Anna Carolina Soares Almeida  
Universidade Federal Rural de Pernambuco**

---

**Dr. Rafael Lima Guimarães  
Universidade Federal de Pernambuco**

**Recife**

**2014**

A Deus, nosso Pai, que me concedeu a oportunidade de concluir esta tese, mesmo ante os grandes desafios aos quais enfrentei durante todo este período. À minha querida esposa, Isadora Macedo, companheira e parceira em todos os momentos. E a todos os familiares que acreditaram na minha capacidade contribuindo para a formação do que sou hoje.

## **Agradecimentos**

Agradeço, primeiramente, à Professora Doutora Maria Tereza Cartaxo Muniz, que aceitou a grande missão de ser minha orientadora com maestria e paciência, estando a me ensinar desde o início da minha jornada acadêmica. Acrescento não tão somente o aparato científico que me foi prestado, mas também pela nossa amizade que foi alicerçada ao longo desses quase nove anos de convivência.

Igualmente agradeço ao Professor Doutor Paulo Roberto Eleutério Souza que, na qualidade de coorientador, aceitou-me em seu projeto, auxiliou na correção dos artigos e me proporcionou amplo acesso na Universidade Federal Rural a fim de ampliar a pesquisa sempre numa postura sensata e flexível.

Agradeço à Professora Doutora Nadja Asano que, como médica do Hospital das Clínicas, forneceu os pacientes analisados em minha tese e todos os respectivos dados clínicos. Importante salientar o apoio na parte experimental e na elaboração dos artigos do amigo e parceiro científico Mestre Hildson Dornelas.

Agradeço também ao Laboratório de Biologia Molecular do CEONHPE/HUOC pelos anos de aprendizado, meu berço acadêmico e científico. A todos os novos componentes hoje presentes e também a todos que já passaram por lá e que de alguma forma colaboraram e me ensinaram algo de forma direta ou indireta em meu caminhar na pesquisa. Por serem tantas pessoas e tantas ajudas fica aqui o meu obrigado generalista, já que não cabem todos nesta simples página.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética do CCB/UFPE pelos oito meses de bolsa concedida que, embora por um curto período, auxiliou-me nos momentos iniciais como aluno do programa.

Ao final, agradeço à minha esposa, Isadora Macedo, que com seu conhecimento técnico jurídico, filosófico, gramatical e metodológico, me deu o aparato suplementar para a elaboração deste trabalho. Além, claro, da sua presença em minha vida.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes. (Marthin Luther King)

## Resumo

O Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune sistêmica e crônica, com uma patogênese envolvendo múltiplos fatores. As citocinas têm um papel crucial no desenvolvimento e progressão do LES. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a associação dos polimorfismos dos genes das interleucinas próinflamatórias *IL2*, *IL12B*, *IL17A*, *IL17F*, *IL23R* e *TNF $\alpha$*  com o desenvolvimento do LES, atividade da doença e manifestações clínicas apresentadas. Foram selecionadas 122 mulheres com Lupus atendidas no Hospital das Clínicas-UFPE. Os polimorfismos *TNF $\alpha$*  (-308 G/A), *IL17A* -197(G/A), *IL17F* (7488 A/G), *IL23R* (2199 A/C) e *IL12B* (3'UTR +1188 A/C) foram identificados por PCR-RFLP e a genotipagem do polimorfismo 3'UTR +1188 (A/C) *IL2* foi por ARMS-PCR. Nossos resultados mostram que os polimorfismos dos genes *TNF $\alpha$*  ( $p=0,0012$ ), *IL17F* ( $p=0,0005$ ), *IL2* ( $p=0,0011$ ), *IL12* ( $p<0,0001$ ) e *IL23R* ( $p<0,0001$ ) estão associados à suscetibilidade ao LES. Nenhum dos polimorfismos mostrou associação com o nível de atividade da doença. Na análise de associação entre os polimorfismos e o desenvolvimento de características clínicas, o alelo A do *TNF $\alpha$*  mostrou associação com o desenvolvimento de Serosite ( $p=0,0228$ ). Além disso, observou-se que polimorfismo do gene *IL12B* mostrou associação com Fator Anti-nuclear (FAN) ( $p<0,0001$ ). Desta forma, concluímos que, na população estudada, polimorfismos em genes de citocinas próinflamatórias e seus receptores podem ser fatores de risco para o desenvolvimento do LES, mas não se associam com a atividade da doença, e que os polimorfismos nos genes *TNF $\alpha$*  e *IL12B* podem influenciar no desenvolvimento de características clínicas da doença.

**Palavras-chave:** Família IL17; Família IL12; Fator de Necrose Tumoral Alfa; Interleucina 2; Lupus eritematoso Sistêmico.

## Abstract

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic systemic autoimmune disease with a complex pathogenesis involving multiple factors. Cytokines may play a crucial role in SLE development and progression. The aim of this study was to evaluate the role of polymorphisms on genes of proinflammatory interleukins IL2, IL12, IL17A, IL17F, IL23R and  $TNF\alpha$  with the development of SLE, disease activity and clinical manifestations. Were selected 122 women SLE positives treated at the Hospital das Clinicas-UFPE. The polymorphisms  $TNF\alpha$  -308(G/A), IL17A -197(G/A), IL17F 7488(A/G), IL23R 2199(A/C), IL12B 3'UTR 1188(A/C) were identified by PCR-RFLP and the genotyping of IL2 -330 (T/G) was by ARMS-PCR. Our results show that polymorphisms of genes  $TNF\alpha$  ( $p=0,0012$ ), IL17F ( $p=0,0005$ ), IL2 ( $p=0,0011$ ), IL12 ( $p<0,0001$ ) and IL23R ( $p<0,0001$ ) were associated with the development of SLE. Neither of polymorphisms showed statistical significance with the Lupus activity. On analysis of association between polymorphisms and the development of clinical features of the disease, the A allele of  $TNF\alpha$  showed association with the development of Serositis ( $p=0,0228$ ). Moreover was observed that the IL12B gene polymorphism was associated with the presence of ANA ( $p<0,0001$ ). Thus, we concluded that in this studied population, polymorphisms in proinflammatory cytokine genes and their receptors may be a risk factors for the SLE development, have no association with disease activity and  $TNF\alpha$  and IL12B may influence in development of clinical aspects of the disease.

**Key words:** IL17 Family; Family IL12; Systemic Lupus Erythematosus; interleukin 2; Tumor Necrosis Factor Alpha.

## Lista de Ilustrações

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>2.3.1-Figura 1:</b> IL12 e IL4 conduzem à diferenciação das células T                             | 10 |
| <b>2.3.3-Figura 2:</b> Mecanismos de diferenciação de células Th17.                                  | 16 |
| <b>2.4-Figura 3:</b> Produção e participação de autoanticorpos na patogênese do LES                  | 18 |
| <b>2.5-Figura 4:</b> Localização do gene <i>TNF<math>\alpha</math></i> no cromossomo 6               | 21 |
| <b>2.5-Figura 5:</b> Processamento e ativação da via de sinalização de <i>TNF<math>\alpha</math></i> | 22 |
| <b>2.6-Figura 6:</b> Localização do gene <i>IL2</i> no cromossomo 4                                  | 25 |
| <b>2.7-Figura 7:</b> Localização do gene <i>IL12A</i> no cromossomo 3                                | 28 |
| <b>2.7-Figura 8:</b> Localização do gene <i>IL12B</i> no cromossomo 5                                | 28 |
| <b>2.7-Figura 9:</b> Estrutura das interleucinas da Família IL12 e seus respectivos receptores       | 29 |
| <b>2.8-Figura 10:</b> Localização do gene <i>IL23R</i> no cromossomo 1                               | 31 |
| <b>2.9-Figura 11:</b> Localização dos genes <i>IL17A</i> e <i>IL17F</i> no cromossomo 6              | 33 |

## Lista de Tabelas

|                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>2.2-Tabela 1:</b> Critérios revisados para diagnóstico do Lúpus Eritematoso                                                                                                                                                   | 5  |
| <b>4.9-Tabela 2:</b> Grupos amostrais de pacientes e controles para os polimorfismos $TNF\alpha$ -308 (G/A), IL2 -330 (T/G), IL12 3'UTR +1188 (A/C), IL17A -197(G/A), IL17F +7488 (A/G) e IL23R +2199 (A/C)                      | 46 |
| <b>5.1-Tabela 3:</b> Prevalência de lúpus eritematoso sistêmico em relação às características Clínicas                                                                                                                           | 48 |
| <b>5.2- Tabela 4:</b> Distribuição genotípica e associação dos polimorfismos - 308(G/A) do $TNF\alpha$ IL2 -330 (T/G), IL12 3'UTR +1188 (A/C), IL17A -197(G/A), IL17F +7488 (A/G) e IL23R +2199 (A/C) em pacientes e controles   | 51 |
| <b>5.3-Tabela 5:</b> Distribuição genotípica dos polimorfismos $TNF\alpha$ -308 (G/A), IL2 -330 (T/G), IL12 3'UTR +1188 (A/C), IL17A -197(G/A), IL17F +7488 (A/G) e IL23R +2199 (A/C) e associação com nível de atividade do LES | 52 |
| <b>5.4-Tabela 6:</b> Associação entre o polimorfismo -308 (G/A) do gene $TNF\alpha$ e as características clínicas do Lúpus                                                                                                       | 53 |
| <b>5.4-Tabela 7:</b> Associação entre o polimorfismo -197(G/A) do gene IL17A e as características clínicas do Lúpus                                                                                                              | 54 |
| <b>5.4-Tabela 8:</b> Associação entre o polimorfismo 7488(A/G) do gene <i>IL17F</i> e as características clínicas do Lúpus                                                                                                       | 55 |
| <b>5.4-Tabela 9:</b> Associação entre o polimorfismo -330 (T/G) do gene <i>IL2</i> e as características clínicas do Lúpus                                                                                                        | 56 |
| <b>5.4-Tabela 10:</b> Associação entre 3'UTR +1188 (A/C) do gene <i>IL12</i> e características clínicas do Lúpus                                                                                                                 | 57 |
| <b>5.4- Tabela 11 -</b> Associação entre o polimorfismo 2199 (A/C) do gene <i>IL23R</i> e características clínicas do Lúpus                                                                                                      | 58 |

## Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

| Item            | Definição                                                                                                |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| APCs            | Células apresentadoras de antígenos do inglês <i>antigen presentation cell</i>                           |
| CREB            | Elemento ligador de proteína responsiva ao ampc do inglês <i>cAMP responsive element binding protein</i> |
| CTEC            | Células epiteliais tímicas corticais do inglês <i>cortical thymic epithelial cells</i>                   |
| CTL             | Células T citotóxicas do inglês <i>cytotoxic T cells</i>                                                 |
| DCs             | Células dendríticas do inglês <i>dendritic cells</i>                                                     |
| DECH            | Doença de enxerto contra o hospedeiro                                                                    |
| DNT             | Células T duplo negativas do inglês <i>double negative T cells</i>                                       |
| dsDNA           | DNA dupla fita do inglês <i>double stranded DNA</i>                                                      |
| ECG             | Eletrocardiograma                                                                                        |
| FAN             | Fator antinúcleo                                                                                         |
| FOXP3           | Forkhead box P3                                                                                          |
| GATA3           | Proteína ligadora gata 3 do inglês <i>GATA binding protein 3</i>                                         |
| Gfi-1           | Fator de crescimento independente 1 do inglês <i>growth factor independent 1</i>                         |
| HLA             | Antígeno Leucocitário Humano do inglês <i>human leucocitary antigen</i>                                  |
| IgE             | Imunoglobulina E                                                                                         |
| IgG             | Imunoglobulina G                                                                                         |
| IL              | Interleucina                                                                                             |
| IL1 $\beta$     | Interleucina 1 $\beta$                                                                                   |
| IL10            | Interleucina 10                                                                                          |
| IL12            | Interleucina 12                                                                                          |
| IL12R $\beta$ 2 | Receptor de interleucina subunidade $\beta$ 2                                                            |
| IL17A           | Interleucina 17 A                                                                                        |
| IL17F           | Interleucina 17 F                                                                                        |
| IL-17R          | Receptor de IL17                                                                                         |
| IL18            | Interleucina 18                                                                                          |
| IL-18R $\alpha$ | Receptor de IL18 subunidade $\alpha$                                                                     |

|                |                                                                                                                |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IL2            | Interleucina 2                                                                                                 |
| IL23           | Interleucina 23                                                                                                |
| IL-23R         | Receptor de Interleucina 23                                                                                    |
| IL27           | Interleucina 27                                                                                                |
| IL-2R          | Receptor de IL2                                                                                                |
| IL35           | Interleucina 35                                                                                                |
| IL6            | Interleucina 6                                                                                                 |
| IL7            | Interleucina 7                                                                                                 |
| INF $\gamma$   | Interferon Gama                                                                                                |
| IRF4           | Fator de regulação 4 de IFN                                                                                    |
| iTreg          | Células T regulatórias Induzidas                                                                               |
| JAK            | Janus Kinase                                                                                                   |
| LES            | Lúpus Eritematoso Sistêmico                                                                                    |
| Lf $\alpha$    | Linfotoxina $\alpha$                                                                                           |
| MHC            | Complexo principal de histocompatibilidade                                                                     |
| mRNA           | Ácido ribonucléico mensageiro                                                                                  |
| mTEC           | Células epiteliais tímicas medulares                                                                           |
| NF- $\kappa$ B | Fator nuclear de transcrição $\kappa$ b                                                                        |
| NFAT           | Fator nuclear de células T ativadas                                                                            |
| NK             | Célula natural killer                                                                                          |
| OR             | Odds Ratio                                                                                                     |
| PCR            | Reação em cadeia da polimerase do inglês <i>polymerase chain reactions</i>                                     |
| ROR $\gamma$ t | Receptor órfão nuclear gamat do inglês <i>orphan nuclear receptor RORgammat</i>                                |
| Runx 3         | Fator 3 de transcrição runt-associado do inglês <i>runt related transcription factor 3</i>                     |
| SLEDAI         | Medida do índice de atividade do lúpus eritematoso do inglês <i>score of lupus erithematosus disease index</i> |
| SNP            | Polimorfismo de Base Única do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i>                                     |
| SOCS-1         | Supressor de Sinalização de Citocina-1 do inglês <i>suppressor of</i>                                          |

*cytokine signaling 1*

|              |                                                                                                                         |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SOCS3        | Supressor de Sinalização de Citocina 3 inglês <i>suppressor of cytokine signaling 1</i>                                 |
| STAT         | Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição do inglês <i>signal-transducer and activator of transcription protein</i> |
| T-bet        | Fator de Transcrição T-Box do inglês <i>T-cell-specific T-box transcription factor</i>                                  |
| TCR          | Receptor de célula T do inglês <i>Tcell receptor</i>                                                                    |
| TGF- $\beta$ | Fator $\beta$ de crescimento de célula T do inglês <i>transforming growth factor, beta 1</i>                            |
| Th           | Células T auxiliares do inglês <i>T helper cells</i>                                                                    |
| Th1          | Células T auxiliares 1 do inglês <i>T helper cells 1</i>                                                                |
| Th17         | Células T auxiliares 17 do inglês <i>T helper cells 17</i>                                                              |
| Th2          | Células T auxiliares 2 do inglês <i>T helper cells 2</i>                                                                |
| TLR          | Receptor Toll-like do inglês <i>Toll-like receptor</i>                                                                  |
| TNF $\alpha$ | Fator de Necrose Tumoral alfa do inglês <i>Tumor necrosis factor alpha</i>                                              |
| TNFR         | Receptor de TNF do inglês <i>Tumor necrosis factor alpha receptor</i>                                                   |
| Treg         | Células T Regulatórias do inglês <i>regulatory T cells</i>                                                              |
| U            | Unidades                                                                                                                |
| UTR          | Região Não Traduzida do inglês <i>untranslated region</i>                                                               |

## Sumário

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introdução .....                                           | 1  |
| 2. Revisão da Literatura .....                                | 3  |
| 2.1 Epidemiologia .....                                       | 3  |
| 2.2 Manifestações Clínicas .....                              | 4  |
| 2.3 A resposta Imune.....                                     | 6  |
| 2.3.1 Diferenciação e função das células Th1.....             | 9  |
| 2.3.2 Diferenciação e Função das células Th2 .....            | 12 |
| 2.3.3 Diferenciação e Função das células Th17 .....           | 14 |
| 2.4 O Papel das Interleucinas na Imunologia do Lúpus.....     | 17 |
| 2.5 Fator De Necrose Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ ).....        | 20 |
| 2.6 Interleucina 2 (IL2).....                                 | 23 |
| 2.7 Interleucina 12 (IL12).....                               | 26 |
| 2.8 A Citocina IL-23 e o Gene IL23R .....                     | 29 |
| 2.9 Interleucina 17A (IL17A) e Interleucina 17F (IL17F) ..... | 32 |
| 2.10 As interleucinas e seus papéis na autoimunidade .....    | 34 |
| 2.10.1 O papel do TNF $\alpha$ na autoimunidade .....         | 34 |
| 2.10.2 O papel da IL2 na autoimunidade .....                  | 35 |
| 2.10.3 O papel da IL12 na autoimunidade .....                 | 37 |
| 2.10.4 O papel da IL-23R na autoimunidade.....                | 37 |
| 2.10.5 O papel da 17A e IL17F na autoimunidade.....           | 38 |
| 3. Objetivos .....                                            | 40 |
| 3.1 Geral .....                                               | 40 |
| 3.2 Específicos .....                                         | 40 |
| 4. Material e Métodos .....                                   | 41 |
| 4.1 Desenho: .....                                            | 41 |
| 4.2 Critérios de inclusão: .....                              | 41 |
| 4.3 Critérios de exclusão .....                               | 41 |
| 4.4 Estratégia de seleção de casos e controles:.....          | 41 |
| 4.5 Material biológico .....                                  | 42 |

|                                                                                                                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.6 Aspectos clínicos e determinação da atividade do lúpus.....                                                                                                                                                                          | 42  |
| 4.7 Seleção de genes .....                                                                                                                                                                                                               | 42  |
| 4.8 Identificação dos polimorfismos das interleucinas. ....                                                                                                                                                                              | 42  |
| 4.8.1 Genotipagem do SNP TNF $\alpha$ -308 (G/A) (Cabrera et al., 1995).....                                                                                                                                                             | 42  |
| 4.8.2 Genotipagem do SNP -330 (T/G) do gene <i>IL2</i> (Franceschi et al., 2009)...                                                                                                                                                      | 43  |
| 4.8.3 Genotipagem do SNP I 3'UTR +1188 (A/C) do gene <i>IL12B</i> (Huang et al., 2000).....                                                                                                                                              | 44  |
| 4.8.4 Genotipagem do SNP IL23R +2199 (A/C) (Chen et al., 2010) .....                                                                                                                                                                     | 45  |
| 4.8.5 Genotipagem dos SNPs <i>IL17A</i> -197(G/A) e <i>IL17F</i> +7488 (A/G) (Wu et al. 2009).....                                                                                                                                       | 45  |
| 4.9 Grupos amostrais .....                                                                                                                                                                                                               | 46  |
| 4.10 Análise dos dados .....                                                                                                                                                                                                             | 47  |
| 4.11 Aspectos éticos.....                                                                                                                                                                                                                | 47  |
| 5. Resultados .....                                                                                                                                                                                                                      | 48  |
| 5.1 Dados Clínicos das Pacientes .....                                                                                                                                                                                                   | 48  |
| 5.2 Associação dos polimorfismos TNF $\alpha$ -308 (G/A), <i>IL2</i> -330 (T/G), <i>IL12</i> 3'UTR +1188 (A/C), <i>IL17A</i> -197(G/A), <i>IL17F</i> +7488 (A/G) e <i>IL23R</i> +2199 (A/C) com o LES .....                              | 48  |
| 5.3 Associação dos polimorfismos TNF $\alpha$ -308 (G/A), <i>IL2</i> -330 (T/G), <i>IL12</i> 3'UTR +1188 (A/C), <i>IL17A</i> -197(G/A), <i>IL17F</i> +7488 (A/G) e <i>IL23R</i> +2199 (A/C) com a atividade do LES.....                  | 51  |
| 5.4 Associação dos polimorfismos TNF $\alpha$ -308 (G/A), <i>IL2</i> -330 (T/G), <i>IL12</i> 3'UTR +1188 (A/C), <i>IL17A</i> -197(G/A), <i>IL17F</i> +7488 (A/G) e <i>IL23R</i> +2199 (A/C) com as características clínicas do LES. .... | 52  |
| 6. Discussão.....                                                                                                                                                                                                                        | 59  |
| 7. Conclusões.....                                                                                                                                                                                                                       | 70  |
| 8. Referências Bibliográficas .....                                                                                                                                                                                                      | 71  |
| ANEXOS .....                                                                                                                                                                                                                             | 91  |
| 10. Curriculum vitae (Lattes) .....                                                                                                                                                                                                      | 113 |

# 1. Introdução

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune sistêmica e crônica, com uma patogênese complexa envolvendo múltiplos fatores genéticos e ambientais. É caracterizada pela produção de auto-anticorpos, anormalidades na função do sistema imune-inflamatório e manifestações inflamatórias em vários órgãos. A doença afeta 0,1% da população mundial e mostra uma predominância no sexo feminino. A causa primária da morbidade e mortalidade é glomerulonefrite, que se desenvolve em aproximadamente 60% dos pacientes.

Tem-se demonstrado que pacientes com LES apresentam uma maior produção de citocinas inflamatórias causando uma desregulação imunológica, tendo consequências patológicas para o paciente, tais como aumento da ativação de células de defesa, aumento da taxa de apoptose e deposição de imunocomplexos em nível tecidual. Embora a patogênese do LES seja ainda desconhecida, o aparecimento em gêmeos monozigóticos e dizigóticos e a distribuição familiar fornecem evidências para o papel dos fatores.

As interleucinas são as responsáveis por regular e coordenar a resposta imune tanto no combate contra agentes nocivos, quanto em reações inflamatórias naturais do organismo. Assim, uma desregulação nestes mediadores imunológicos pode ser o ponto de partida para o desenvolvimento de várias doenças imunológicas, como exemplo as autoimunes.

Polimorfismos na região promotora de genes podem alterar seu perfil de expressão, levando a uma maior ou menor produção do seu produto gênico, além disso, polimorfismos em regiões codificantes podem alterar a sequência de aminoácidos, o que afetaria sua conformação tridimensional e,

consequentemente, sua função. Várias doenças têm sido associadas aos polimorfismos de base única (SNP), pelo fato de alguns destes polimorfismos alterarem o comportamento natural de genes chaves nos processos fisiológicos.

Desta forma, o presente trabalho irá abordar o papel polimorfismos em genes de citocinas pró-inflamatórias como -308(G/A) do gene *TNF $\alpha$*  (rs1800629), -330(T/G) do gene *IL2* (rs2069762), 3'UTR +1188(A/C) do gene *IL12* (rs3212227), -197(G/A) do gene *IL17A* (rs2275913), +7488(A/G) do gene *IL17F* (rs763780) bem como o SNP do receptor da IL23, o +2199(A/C) do gene *IL23R* (rs10889677) na susceptibilidade, atividade e características clínicas da doença

Na literatura médica mundial, são encontrados vários estudos controversos que tentam associar estes polimorfismos com a predisposição, progressão e gravidade do quadro clínico de pacientes com várias doenças autoimunes. Entretanto, ainda há uma escassez de pesquisas que avaliem a associação destes SNPs com o Lúpus, sendo este o primeiro trabalho a avaliá-los com esta doença no Brasil e especificamente para os polimorfismos -330(T/G) do gene *IL2* (rs2069762), -197(G/A) do gene *IL17A* (rs2275913) e +7488(A/G) do gene *IL17F* (rs763780) no âmbito mundial.

O estudo da associação dos polimorfismos destas interleucinas com a susceptibilidade, atividade e características clínicas da doença, poderá levar, a uma melhor compreensão de como tais SNPs podem influenciar nos vários aspectos do Lúpus Eritematoso Sistêmico. Os resultados deste estudo embasarão futuras pesquisas que desenvolvam métodos de diagnósticos mais precisos e precoces, o que poderá levar a antecipação de ações clínicas para evitar o desencadeamento do LES, bem como indicar possíveis alvos de novas terapias para a doença.

## **2. Revisão da Literatura**

### **2.1 Epidemiologia**

Na literatura mundial a prevalência e a incidência do LES são bastante variáveis na maioria das populações estudadas. Embora possa ocorrer em ambos os sexos e em qualquer faixa etária (Freire et al., 2011). O LES é uma doença rara, incidindo mais frequentemente em mulheres jovens na faixa etária de 15 a 40 anos (Reis & Costa, 2010), ou seja, na fase reprodutiva, numa proporção de 9:1 em relação ao sexo masculino com prevalência, em estudos norte-americanos, variando de 14 a 143,7/100.000 habitantes (Ayache & Costa, 2005; El et al., 2006; Nonato et al., 2010; Feldman et al., 2013).

O LES acomete uma em cada 1.000 pessoas da raça branca e uma em cada 250 pessoas negras. Embora seja mais prevalente na raça negra, pode ocorrer em todas as etnias e regiões geográficas (Ayache & Costa, 2005). A doença tem um componente genético e agregação familiar. Foi encontrada uma prevalência familiar de 5,6%, para um parente de primeiro grau (Alarcon-Segovia et al., 2005). A concordância da doença em gêmeos dizigóticos é de 2-5%, e em gêmeos monozigóticos 29-57% (Michel et al., 2001; Moser et al., 2009) sugerindo que apesar de os genes serem importantes, eles não são a única causa do desenvolvimento da doença. Presume-se que fatores ambientais desempenhem um papel importante no desenvolvimento da doença e da expressão incompleta em gêmeos monozigóticos (Askanase et al., 2012).

No Brasil, não há grandes estudos referentes especificamente aos dados epidemiológicos do Lúpus, porém, dois estudos realizados no país mostram incidências distintas em duas diferentes regiões do país, um foi realizado na

cidade de Natal-RN e indicava uma estimativa de 8,7 casos por 100.000 habitantes, no ano de 2000. Essa incidência tão alta pode ser devida às diferenças genéticas ou ambientais, como a maior exposição solar. Outro estudo realizado na cidade de Cascavel/PR mostra uma incidência de 4,8 casos por 100.00 habitantes (Nakashima et al., 2011).

Em pacientes que sobrevivem por mais de 10 anos, a causa de morte com frequência não está relacionada com a atividade da doença, e sim com os danos crônicos causados pela doença ou por sua terapêutica. Para a descrição do prognóstico em LES, os pacientes devem ser avaliados para a atividade da doença, danos acumulados, como também para a qualidade de vida (Freire et al., 2011).

## **2.2 Manifestações Clínicas**

Os imunocomplexos existentes no LES formam-se na circulação ou *in situ*, através da interação entre autoanticorpos e antígenos dos próprios pacientes, sendo estes responsáveis pelas manifestações clínicas características da inflamação de múltiplos órgãos, tais como nefrite, artrite e vasculite e, portanto, responsáveis pelo dano a esses órgãos (Bave et al., 2003). A perda de tolerância aos antígenos nucleares e outros componentes próprios é mencionada como mecanismo contribuinte para a formação de autoanticorpos e imunocomplexos, assim como o decréscimo da depuração de imunocomplexos e a ativação anormal das células B e T (Fine, 2005). A tolerância imunológica pode ser afetada pela diminuição do limiar de ativação dos linfócitos, devida a mutações em genes críticos para o processo de tolerância ou alterações em genes da maquinaria

apoptótica, que seriam responsáveis pela não deleção de linfócitos auto-reativos (Tsukumo & Yasutomo, 2004).

A Academia Americana de Reumatologia (1982) adotou uma lista de onze critérios utilizados para o diagnóstico do Lúpus, no qual indivíduos que apresentem ao menos quatro destes critérios são considerados portadores da doença. Em 1997 estes critérios foram revisados por Rochberg (1997)(Tabela 1).

**Tabela 1:** Critérios utilizados para diagnóstico do Lúpus Eritematoso revisado por Rochberg (1997)

| CRITÉRIO                 | DEFINIÇÃO                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Eritema Malar            | Eritema fixo, plano ou elevado sobre as eminências malares com tendência a poupar a região nasolabial                                                                                                                                                                                               |
| Lesão Discoide           | Lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia                                                                                                                                                                |
| Fotosensibilidade        | Eritema cutâneo resultante de reação incomum ao sol, por história do paciente ou observação do médico                                                                                                                                                                                               |
| Úlceras orais            | Ulceração oral ou nasofaríngea, habitualmente indolor observada pelo médico                                                                                                                                                                                                                         |
| Artrite                  | Artrite não erosiva com acometimento de duas ou mais articulações periféricas caracterizada por dor à apalpação, tumefação ou derrame                                                                                                                                                               |
| Serosite                 | (a) pleurite – relato convincente de dor pleurítica ou atrito auscultado por um médico ou evidências de derrame pleural; (b) pericardite – documentada por ECG ou atrito auscultado pelo médico ou evidências de derrame pericárdico                                                                |
| Alteração Renal          | (a) proteinúria persistente superior a 0,5g/dia ou superior a 3+ quando não se realiza quantificação;(b) cilindros celulares – podem ser hemáticos, de Hb, granulares, tubulares ou mistos                                                                                                          |
| Alterações Neurológicas  | (a) convulsão – na ausência de fármacos implicados ou alterações metabólicas conhecidas (ex. uremia, cetoacidose, distúrbios hidroeletrólíticos), ou (b) psicose – na ausência de fármacos implicados ou alterações metabólicas conhecidas (ex. uremia, cetoacidose, distúrbios hidroeletrólíticos) |
| Alterações hematológicas | (a) anemia hemolítica com reticulocitose, ou (b) leucopenia - menor que 4000/mm <sup>3</sup> total em 2 ou mais ocasiões, ou (c) linfopenia - menor que 1.500/mm <sup>3</sup> em 2 ou mais ocasiões, ou (d) trombocitopenia - menor que 100.000/mm <sup>3</sup> na ausência de fármacos causadores  |

|                         |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-------------------------|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Alterações imunológicas |       | (a) presença de anti-DNA nativo, ou (b) presença de anti-Sm, ou (c) achados positivos de anticorpos antifosfolípides baseados em (1) concentração sérica anormal de anticardiolipina IgG ou IgM, (2) teste positivo para anticoagulante lúpico, usando teste-padrão ou (3) VDRL falso positivo, por pelo menos 6 meses e confirmado por FTA-Abs negativo |
| Anticorpo nuclear (FAN) | Anti- | título anormal do FAN por imunofluorescência ou método equivalente em qualquer momento, na ausência de fármacos sabidamente associados ao lúpus induzido por fármacos                                                                                                                                                                                    |

---

Fonte: adaptado de HOCHBERG (1997)

Embora a positividade para o FAN (fator antinuclear) esteja presente em mais de 95% dos pacientes com a doença ativa, é um teste com baixa especificidade. Presença de FAN em títulos de diluição superiores a 1:80 são considerados significativos (Dellavance et al., 2009). Nos casos com pesquisa de FAN negativa, particularmente com lesões cutâneas fotossensíveis, recomenda-se a realização da pesquisa de anticorpos anti-Ro/SSA e anti-La/SSB. Anticorpos anti-DNA nativo e anticorpos anti-Sm são considerados testes específicos, mas têm baixa sensibilidade. A presença de anticorpos tem valor clínico quando ocorrer em pacientes com manifestações compatíveis com o diagnóstico de LES (Brasil, 2012).

## 2.3 A resposta Imune

Todos os indivíduos saudáveis apresentam sistema imunológico ativo. Essa capacidade do sistema imune faz com que o corpo produza uma resposta eficaz contra qualquer antígeno eliminando o elemento “estranho” (Vianna et al., 2010). Cada vez mais se acumulam evidências de que o sistema imunitário é constituído por uma rede complexa e é articulado por inúmeros componentes integrados. Podemos citar as células com seus diversos receptores, mediadores

secretados, moléculas expressas, vias bioquímicas acionadas, entre outros componentes que, em conjunto e em diferentes sítios anatômicos, dotam o organismo da capacidade de interagir com os diferentes estímulos antigênicos (Cruvinel et al., 2008).

Embora a resposta imune seja fundamental para a defesa contra a maioria de agentes infectantes, nos últimos anos têm sido acumuladas evidências de que, em muitas doenças infecciosas, os principais aspectos patológicos não estão relacionados com uma ação direta do agente agressor, mas sim com uma resposta imune anormal (Machado et al., 2004).

Os mecanismos de proteção vistos de uma maneira mais ampla podem ser classificados em duas grandes categorias (Abbas et al., 2008):

1. **Imunidade Natural**- também chamada de imunidade inata ou nativa, é a linha de defesa inicial contra os micro-organismos, consistindo em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que estão programados para responder rapidamente a infecções sendo seus principais componentes: a) barreiras físicas e químicas; b) células fagocitárias e células Natural Killer (NK); c) sistema complemento; d) citocinas que coordenam várias atividades das células da imunidade natural;
2. **Imunidade Adaptativa ou Adquirida**- grupo de respostas imunológicas que são estimuladas pela exposição a agentes infecciosos cuja magnitude e capacidade defensiva aumentam com exposições posteriores a um microrganismo em particular, tendo grande especificidade, capacidade de memória, expansão clonal e tolerância a autoantígenos em que, a perda desta última característica, leva ao desenvolvimento de doenças

autoimunes. Os principais componentes da imunidade adquirida incluem os linfócitos e seus produtos, sendo estas células ativadas mediante exposição a antígenos.

Células T precursoras, provenientes de uma célula-tronco hematopoiética linfóide, saem da medula óssea para alcançar o timo para maturação. Inicialmente pensado para ser um resquício evolutivo com função desprezível, o timo é na verdade um órgão linfóide primário indispensável para o desenvolvimento de linfócitos T proporcionando um microambiente adequado com a combinação específica de células estromais, citocinas e quimiocinas, para gerar células T funcionais a partir de precursoras de células T (timócitos). O rearranjo do gene do receptor de células T (TCR) e a seleção de timócitos são os passos críticos no desenvolvimento dos linfócitos T maduras capazes de reconhecer uma gama infinita de antígenos (Luckheeram et al., 2012).

Durante o processo de diferenciação, a migração de timócitos através dos microambientes do timo e o contato com o complexo peptídeo-MHC (pMHC) com distintas células apresentadoras de antígenos (APCs) do timo, incluindo as células epiteliais tímicas corticais (CTECs), células epiteliais tímicas (medulares mTECs), e as células dendríticas (DCs), desempenham um papel crucial na formação do repertório de células T para reconhecimento do antígeno, o processo de seleção, e a expressão de moléculas de superfície, tais como CD4 e CD8 (Gill et al., 2003; Takahama et al., 2006; Klein et al., 2009). O processo de seleção pode ser descrito pelo modelo de afinidade, em que os timócitos que expressam TCR com afinidade insignificante para pMHC morrem e aqueles com afinidade muito elevada são destruídas (seleção negativa). Apenas os timócitos com TCR de afinidade intermédia para pMHC são submetidos à seleção positiva e

diferenciação nos principais linfócitos T maduros: as CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Daniels et al., 2006; Gill et al., 2003; Klein et al., 2009; Takahama et al., 2006).

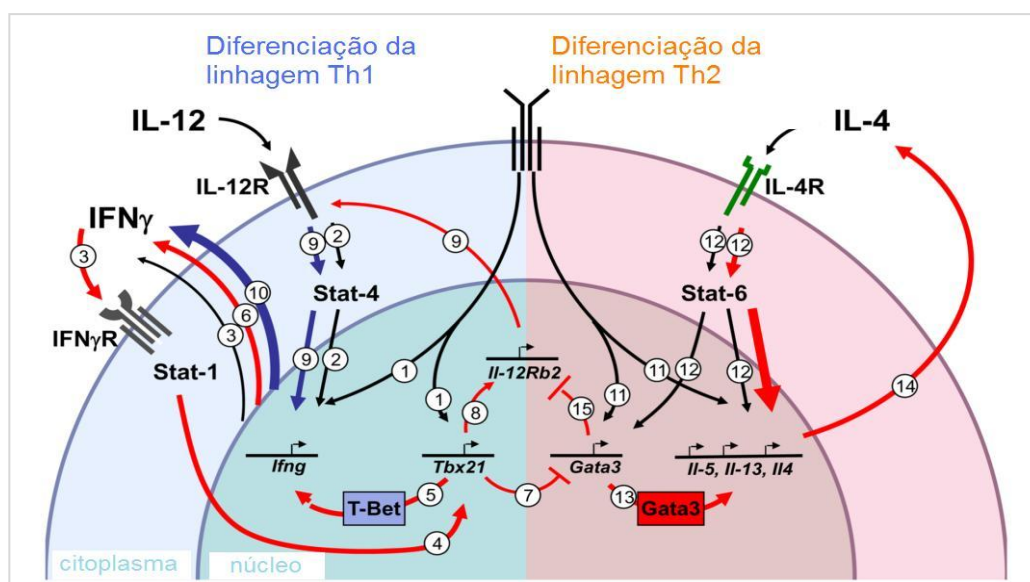
O passo inicial de diferenciação das células *naïve* é a estimulação antigênica, como resultado da interação do CD4 e TCR como co-receptores com o complexo antígeno-MHCII, apresentado por células apresentadoras de antígenos (APCs). TCR acoplado com o CD3 ativado induz a uma rede de vias de sinalização a *downstream*, que eventualmente levam a proliferação e diferenciação das células *naïve* em células efetoras específicas. A diferenciação de uma linhagem específica depende do meio de citocinas do microambiente, bem como a concentração dos antígenos, tipo de APCs e as moléculas de co-estimulação (Tao et al, 1997; Ashkar et al., 2000).

### **2.3.1 Diferenciação e função das células Th1**

A interleucina 12 (IL12) e Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) são as citocinas críticas de iniciação da cascata de sinalização a *downstream* para diferenciação de células Th1 (Trinchieri et al., 2003). IL12 é secretada em grandes quantidades por APCs após a sua ativação através de receptores padrões de reconhecimento (Steinman et al., 2003; Iwasaki et al., 2004; Trinchieri & Sher, 2007). A IL12, por sua vez, induz as células *natural killer* (NK) a produzir IFN $\gamma$ . Vários fatores de transcrição, em coordenação induzem a diferenciação completa das células Th1 que são Tbet, STAT1, STAT4, Runx 3, Eomes e Hlx (Luckheeram et al., 2012). O regulador principal para a diferenciação da linhagem Th1, o fator de transcrição T-box (Tbet), é necessário não só pela sua capacidade de ativar o conjunto de genes que promove a diferenciação de um determinado fenótipo, mas também por ser capaz de suprimir o desenvolvimento de linhagens celulares opostas (Afkarian et al.,

2002; Lugo-Villarino et al., 2003). T-bet é o principal fator de transcrição, uma vez que melhora significativamente a produção de IFN $\gamma$ , e desempenha um papel importante na supressão do desenvolvimento de Th2 e Th17 (Lazarevic et al., 2011; Lugo-Villarino et al., 2003).

Foi observado que a expressão do T-bet é mais fortemente dependente do sinal transdutor e ativador de transcrição 1 (STAT1) do que o STAT4 que é dependente de IL12 (Afkarin et al., 2002; Lighvani et al., 2001). O STAT1, por sua vez, é ativado pelo IFN $\gamma$ . T-bet induz ainda mais a produção de IFN $\gamma$  pelas células em diferenciação, amplificando assim a expressão de T-bet e um aumento da expressão do receptor IL12R $\beta$ 2. As últimas células podem então ser selecionadas pela abundante quantidade de IL12 excretada pelas APCs, garantindo assim, a expansão seletiva das células Th1 em diferenciação (Afkarin et al., 2002). T-bet reprime o desenvolvimento de células Th2, inibindo o gene crucial IL4 e bloqueando a função do principal regulador de Th2 o GATA3 (Djuretic et al., 2007; Hwang et al., 2005).



**Figura 1. IL12 e IL4 conduzem a diferenciação das células T: Diferenciação da TH1 por IL12:** (1) ativação inicial da TCR induz a um baixo nível de expressão de IFNG e Tbx21; (2) A sinalização através dos receptores de IL12 resulta na indução de STAT4 mediada pela expressão

de IFN $\gamma$ ; **(3)** A ligação do receptor de IFN $\gamma$  por baixa quantidade inicial de IFN $\gamma$  por via auto/parácrino ativa STAT1, **(4)** que promove fortemente a expressão do gene Tbx21. **(5)** T-bet, em seguida, aumenta a capacidade de transcrição do gene de IFN $\gamma$  **(6)** que conduz a um aumento da produção de citocina. **(7)** Além disso, o T-bet previne a diferenciação de Th2, inibindo GATA3. **(8)** Por fim, T-bet promove a expressão da cadeia  $\beta 2$  do receptor da IL12, **(9)** o que resulta em uma maior capacidade de resposta IL12 **(10)** e ainda eleva a produção de IFN $\gamma$ . Diferenciação da Th2 por IL4: **(11)** a sinalização inicial do TCR induz a baixos níveis de expressão dos genes IL4 e GATA3. **(12)** A sinalização do receptor de IL4 promove fortemente a expressão destes dois genes. **(13)** GATA3 reorganiza a estrutura da cromatina no local de Th2, que abrange os genes IL4, IL5 e IL13, aumentando a sua capacidade de transcrição. **(14)** Aumento da produção de IL4 aumenta ainda mais a diferenciação de células TH2 em um *feedback* positivo. Finalmente, GATA3 impede o programa de diferenciação do tipo Th1, inibindo a expressão da cadeia  $\beta 2$  receptor de IL-12 **(14)** e do gene Stat4 (não representado). Eventos primários são indicados com setas pretas, eventos secundários com setas vermelhas e eventos de ensino superior com setas azuis. Adaptado de Amsen et al., 2009.

A linhagem Th17 é inibida pela interação de T-bet com o promotor do Rorc, que codifica ROR $\gamma$ t, o principal fator de transcrição de Th17 (Lazarevic et al., 2011).

A STAT4 induzida por IL12 é outro importante fator de transcrição envolvido na diferenciação de células Th1 (Thierfelder et al., 1996). O STAT4 induz a produção de IFN $\gamma$ , criando assim, um circuito de realimentação positiva para mais T-bet e mais expressão de IL12R $\beta 2$  (Aune et al., 2009). Em fases posteriores de diferenciação, a via IL12/STAT4 aumenta a expressão de IL-18R $\alpha$ . IL12 juntamente com IL18 induz a produção IFN $\gamma$  independente da ativação de TCR, criando assim, uma via para aumentar a resposta de Th1 (Luckeeham et al., 2012).

Células Th1 estão envolvidas com a eliminação de agentes patogênicos intracelulares e estão associados com a autoimunidade de órgãos específicos (del Prete, 1992). Elas principalmente secretam IFN $\gamma$ , Linfotóxina  $\alpha$  (L $\alpha$ ) e IL2. IFN $\gamma$  é essencial para a ativação dos fagócitos mononucleares, incluindo macrófagos e

células microgliais, resultando assim, em aumento da atividade fagocítica (Murray et al., 1985). Acredita-se que IFN $\gamma$  exerça o seu efeito através da ativação de genes responsivos à sua ativação, podendo ser mais de 200 (Boehm et al., 1997). Lf $\alpha$  é um membro da superfamília TNF e está associado com doenças autoimunes. A depleção de Lf $\alpha$  tem mostrado, de forma experimental, inibir o desenvolvimento de encefalite autoimune (Chiang et al., 2009). IL2 promove a proliferação de células T CD8 $^{+}$  citotóxicas (Kim et al., 2006). Além do seu papel como fator de crescimento de células T, IL2 também promove o desenvolvimento de células CD8 $^{+}$  de memória após a ativação por antígeno participando em uma acentuada resposta imune secundária (Williams et al., 2006).

### **2.3.2 Diferenciação e Função das células Th2**

As IL4 e IL2 são fundamentais para diferenciação Th2. O principal fator de transcrição envolvido na diferenciação da linhagem Th2 inclui o STAT6 (induzido por IL4), que aumenta a expressão do GATA3 (proteína ligadora GATA) (Kaplan et al., 1996; Glimcher & Murphy, 2000; Zhu et al., 2001). Três mecanismos distintos da função de GATA3 na diferenciação de Th2 têm sido postulados, incluindo o aumento da produção de citocina pelas Th2, proliferação seletiva de células Th2 através do recrutamento de Gfi-1, e a inibição da diferenciação de Th1, presumivelmente através da interação com T-bet (Zhu et al., 2006). Além disso, GATA3 suprime a diferenciação de Th1 por supressão da expressão STAT4 (Usui et al., 2003). *In vivo*, GATA3 é indispensável para uma resposta Th2. Nos ratos deficientes em GATA3, a diferenciação de células naíve foi desviada para a linhagem Th1 (Zhu et al., 2004). A ausência de GATA3 leva à

interrupção da diferenciação Th2 (Pai et al., 2004; Zhu et al., 2004; Zhu et al., 2006).

Apesar de IL4 e de IL2 serem necessárias para o desenvolvimento de células Th2 *in vitro*, há evidências de diferenciação *in vivo* de Th2 independentemente de IL4. Porém, enquanto GATA3 é indispensável para diferenciação de células Th2 *in vivo*, pode-se sugerir que existe uma via de ativação de GATA3 independente de IL4 (Boehm et al., 1997; Halonen et al., 2001). Além disso, a diferenciação das células Th2 envolve vários outros fatores de transcrição ativados a *downstream* de várias citocinas, incluindo IL2, IL6, e IL21 (Luckeeham et al., 2012).

A IL6, abundantemente produzida por APCs, bem como por células não imunes, desempenha um papel duplo na diferenciação da linhagem Th2. Ela promove a diferenciação de Th2, enquanto que simultaneamente inibe a linhagem Th1. A via de sinalização *downstream* de IL6 a favor da diferenciação Th2 é dependente de IL4. IL6 aumenta a produção de IL4 nas células naíve CD4+ através da indução do Fator Nuclear de Células T Ativadas (NFAT) (Diehl & M. Rincón, 2002). A inibição do desenvolvimento de Th1 ocorre através do aumento da expressão, induzida pela IL6, do supressor de sinalização de citocina-1 (SOCS-1), o que interfere com a ativação de STAT1 e consequentemente na via de sinalização de IFN $\gamma$  (Diehl et al., 2000).

As células Th2 são responsáveis pela resposta imune aos parasitas extracelulares, incluindo os helmintos, e desempenham um papel importante na indução e persistência da asma bem como de outras doenças alérgicas (del Prete, 1992; Sokol et al., 2009). As principais citocinas efetoras compreendem IL4, IL5, IL9, IL13, IL10 e IL25 na qual a IL4 é uma das principais citocinas

envolvidas na resposta alérgica. Ela está envolvida na produção e secreção de IgE pelas células B. A IL4 também aumenta a produção do receptor de baixa afinidade de IgE (FcεRI) em linfócitos B e fagócitos mononucleares, e também do receptor de alta afinidade de IgE (FcεRII) em mastócitos e basófilos com subsequente desgranulação das células e liberação de vários metabólitos ativos, incluindo histamina e serotonina (Steinke & Borish, 2001).

### **2.3.3 Diferenciação e Função das células Th17**

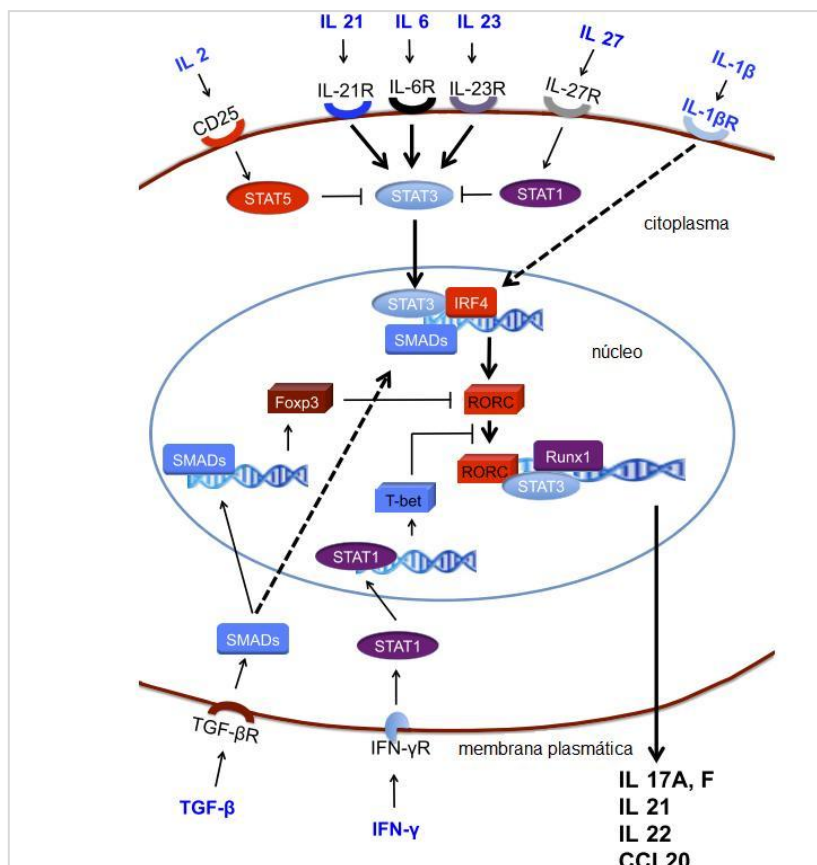
Vários grupos mostraram de forma convincente que o TGF- $\beta$  e IL6, citocinas com efeitos opostos, tem efeito sinérgico para induzir receptor nuclear órfão ROR $\gamma$ t, que coordena a expressão de IL17A e IL17F em células T naíve (Veldhoen et al., 2006; Bettelli et al., 2006; Mangan et al., 2006). TGF- $\beta$  é produzido em várias linhagens de leucócitos e células estromais, uma importante fonte autócrina ou parácrina de TGF- $\beta$  para a diferenciação *in vivo* Th17 (Bettelli et al., 2006; Veldhoen et al., 2006 b; Gutcher et al., 2011). Assim, TGF- $\beta$  derivado de Treg permite a diferenciação de células Th17 quando as células T virgens são co-cultivadas com DCs. Células Th17 também podem expressar grandes quantidades de TGF- $\beta$ , e essa citocina pode atuar de uma forma autócrina para manter as células Th17 *in vivo* (Gutcher et al., 2011). Além disso, o TNF e IL1 $\beta$  aumentam a diferenciação das células Th17 mediada por TGF- $\beta$  e IL6 (Veldhoen et al., 2006 [a]).

A diferenciação das células T para o subconjunto TH17 é induzida quando iniciação ocorre na presença de TGF- $\beta$  e certas citocinas inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , IL6 ou IL2. Curiosamente, tem sido proposta que a diferenciação de células *naíve* para este subconjunto pró-inflamatório ocorra de uma forma recíproca com

o desenvolvimento de células T reguladoras (Treg) e a presença de um sinal inflamatório supõe-se que seja o fator que determina se células pró-inflamatórias ou células supressoras são geradas (Yang et al., 2008).

No entanto, as vias de sinalização de TGF $\beta$  também desempenham papel significativo no desenvolvimento de células T-regulatórias induzidas (iTreg), um subconjunto de células T CD4. Th17 e iTreg são antagonicamente relacionados. TGF $\beta$  sozinho, em concentração elevada, pode desviar a diferenciação da linhagem para o desenvolvimento iTreg, através da indução de FOXP3 (Chen et al., 2008; Zhou et al., 2008). No entanto, em baixa concentração e na presença de IL-6, TGF- $\beta$  induz a diferenciação de células Th17, a produção de IL21 e regula positivamente a expressão de IL23R (Miossec et al., 2009; Wei et al., 2009; Esplugues et al., 2011). Uma vez que a sinalização TGF- $\beta$ , ao contrário de IL6, IL21 e IL23, não ativa STAT3, o seu papel parece envolver acentuação da ativação de STAT3. TGF- $\beta$  inibe a expressão do supressor de sinalização de citocina 3 (SOCS3) induzida por IL6/IL21, que regula negativamente a vias de sinalização STAT3 (Qin et al., 2009).

O STAT3, ativado a downstream de IL6, IL21 e IL23, desempenha um papel importante no processo de diferenciação induzindo a expressão ROR $\gamma$ t. A deficiência de STAT3 foi associada com o aumento da expressão de T-bet e FOXP3, que estão envolvidos no desenvolvimento de linhagens de células opostas (Yang et al., 2007). O ROR $\alpha$ , outro membro da família do ROR, também participa na via de diferenciação da linhagem. Juntos ROR $\alpha$  e ROR $\gamma$ t sinergicamente aumentam a diferenciação Th17, e sua ausência aborta completamente o desenvolvimento de células Th17 (Yang et al., 2008) (Figura 2).



**Figura 2: Mecanismos de diferenciação de células Th17.** TGF- $\beta$  é essencial para a geração de Th17 através da indução de FoxP3 e RORC. No entanto, na ausência de inflamação, FoxP3 reprime RORC e promove iTregs. A sinalização através de citocinas inflamatórias, tais como IL6, IL21 e IL23 resulta em fosforilação da STAT3, alivia RORC da supressão de FoxP3, e inicia a programação Th17. STAT3 em combinação com fator de regulação 4 de IFN (IRF4) induz a expressão mais RORC. Fatores de transcrição STAT3, RORC, e Runx1 ligam às regiões promotoras da IL17, IL21, IL22 e genes CCL20 e induzir IL17, IL21, IL22 e CCL20. A programação de Th17 pode ser antagonizada por citocinas, tais como IFN $\gamma$ , IL2 e IL-27. IL2 e IL27 com ativação mediada por STAT5 e STAT1 inibem STAT3, enquanto T-bet induzida por IFN $\gamma$  pode bloquear RORC. Adaptado de Maddur et al., 2012.

As células Th17 são responsáveis por montar resposta imune contra bactérias extracelulares e fungos. Elas também estão envolvidas na geração de doenças autoimunes (Ivanov et al., 2006; Weaver et al., 2006). As principais citocinas efetoras incluem IL17A, IL17F, IL21 e IL22. A sinalização da IL17A e IL17F ocorre através de um receptor comum, IL17RA, sugerindo, assim, funções semelhantes (Gaffen et al., 2009). Uma vez que o receptor IL17RA é expresso em

vários tecidos, tais como tecido hematopoietico, pele, pulmão, intestino e articulações, o efeito de IL17 se estende para além da resposta inflamatória mediada pelas células T. A IL17 acarreta à indução de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL6, IL1,  $TNF\alpha$ , e também as quimiocinas pró-inflamatórias que asseguram a quimiotaxia de células inflamatórias para os locais de inflamação (Moseley et al., 2003; Weaver et al., 2006). A IL21, além de ser uma citocina de amplificação para o desenvolvimento Th17, tem funções pleiotrópicas que inclui a ativação de células T, induzindo as células B a se diferenciarem em plasmócitos e células de memória, e ativar células NK (Leonard & Spolski, 2005; Korn et al., 2007).

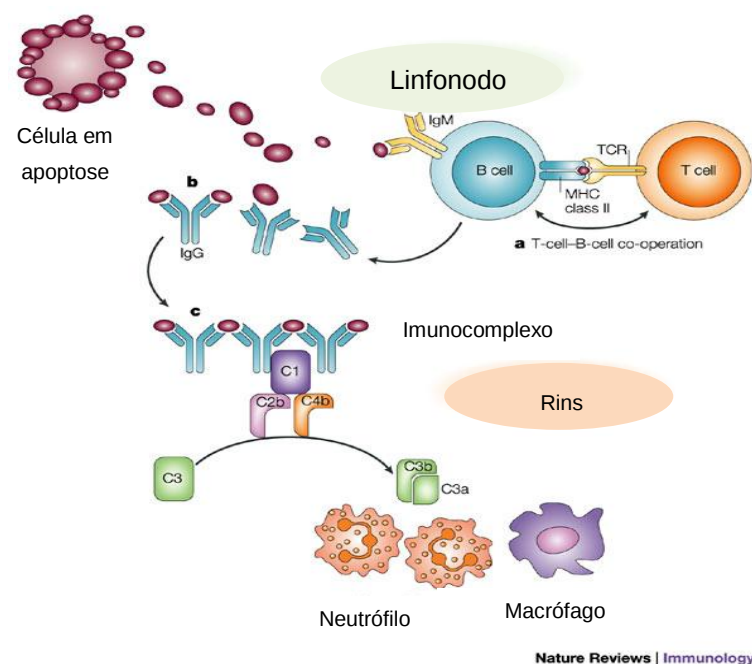
## **2.4 O Papel das Interleucinas na Imunologia do Lúpus**

As doenças autoimunes são síndromes clínicas distintas caracterizadas por várias alterações na resposta imune normal, com perda da tolerância para constituintes do próprio hospedeiro. São divididas em sistêmicas e órgão específicas. Dentre as doenças autoimunes inflamatórias sistêmicas estão incluídas a artrite reumatóide, o LES, a dermatomiosite, a polimiosite, a esclerose sistêmica, as vasculites e a síndrome de Sjögren (Viggiano et al., 2008). O LES é caracterizado pela hiperativação de células B e elevada produção de anticorpos IgG, o que resulta em deposição de imunocomplexos nos tecidos e subsequente destruição do tecido conjuntivo e de múltiplos órgãos (Miceli et al., 2005).

O envolvimento genético no LES é provavelmente complexo e envolve os múltiplos genes que codificam moléculas diferentes com funções significativas no regulamento do sistema imunitário (Prokunina & Alarcon-Riquelme, 2004). A apoptose é uma importante fonte de auto-antígenos no Lúpus (Walport, 2000) e,

consistente com esta ideia, estudos mostraram que a imunização de animais com restos celulares em grandes quantidades além da indução na deficiência de depuração de restos celulares apoptóticos, levaram ao comportamento imunológico semelhante ao do Lúpus (Mevorach et al. 1998; Cohen et al. 2002). Na Figura 3 está ilustrada a formação de autoanticorpos a partir de moléculas geradas do processo apoptótico e posterior ativação da resposta inflamatória através do sistema complemento.

Entre os fatores genéticos que se acredita influenciar na susceptibilidade ao LES, alelos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) mostram associações mais significativas, contudo, vários estudos mostram que genes não fazem parte do *loci* Antígeno Leucocitário Humano (HLA) têm função no desenvolvimento da LES (Cantor et al., 2004; Tucci et al., 2004).



**Figura 3:** Produção e participação de autoanticorpos na patogênese do LES; **Legenda:** **B cell** – Célula B; **T cell** – Célula T; **IgG** – Imunoglobulina G; **IgM** – Imunoglobulina M; **TCR** – Receptor de Célula T; **MHC**–Complexo principal de histocompatibilidade; **“C”** – Proteínas do sistema complemento. Adaptado de Carroll, 2004.

Entretanto, a influência genética isoladamente nem sempre é uma condição suficiente para induzir o lúpus e fatores ambientais podem ter uma participação importante. Sabe-se que a luz ultravioleta (40 a 60% dos pacientes são fotossensíveis), alguns fármacos (como a hidralazina e a procainamida), dietas ricas em gorduras saturadas, poluentes, cigarro e muitas vezes o estresse físico ou psicológico extremo também podem desencadear ou agravar o LES (Crow & Fredman, 1997). Há ainda fatores que começam a ganhar importância nos dias de hoje como alimentos transgênicos (pelo suposto estímulo à reação autoimune), substâncias como resinas e óleos pesados, implantes cutâneos dérmicos e subcutâneos, os quais podem ser capazes de estimular a produção de autoanticorpos (Duarte, 2004).

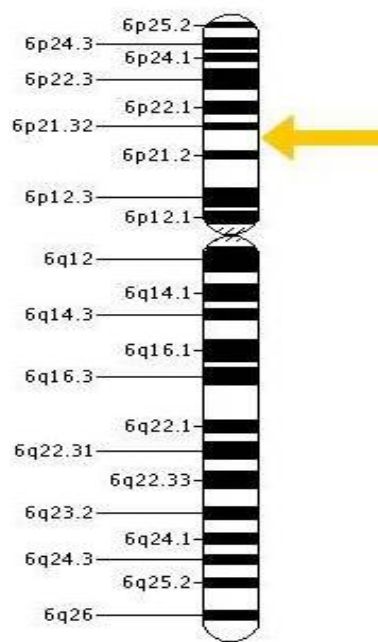
Várias evidências demonstram que as citocinas possuem um papel importante no desenvolvimento inflamatório e progressão de doenças autoimunes como LES (Gibson et al., 2001; Guarnizo-Zuccardi et al., 2007; Rosado *et al.*, 2008). Além disso, tem-se demonstrado que pacientes de LES têm uma expressão aumentada das moléculas inflamatórias (Lit et al., 2006).

As citocinas são potentes imunomoduladores moleculares que medeiam a inflamação e a resposta imune. Na última década, tem-se abordado de forma cada vez mais aplicada as citocinas e suas implicações nas mais variadas áreas do conhecimento médico (Crispín et al., 2011). Diversos polimorfismos nos genes das citocinas podem ser responsáveis por alterações na sua produção, sendo então participantes efetivos na patogênese de diversas doenças, como câncer, doenças metabólicas, infecciosas e autoimunes, assim como, em condições inflamatórias (Franceschi et al., 2009).

## 2.5 Fator De Necrose Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ )

O TNF $\alpha$  foi identificado em 1975 como uma glicoproteína induzida por endotoxina, que causou a necrose hemorrágica de sarcomas que tinham sido transplantados em ratos (Carswell et al., 1975). O fator de necrose tumoral humano foi clonado em 1985 e foi mostrado que o TNF recombinante para induziu a necrose hemorrágica de sarcomas transplantados em ratos induzidos por metilcolantreno (Pennica et al., 1985).

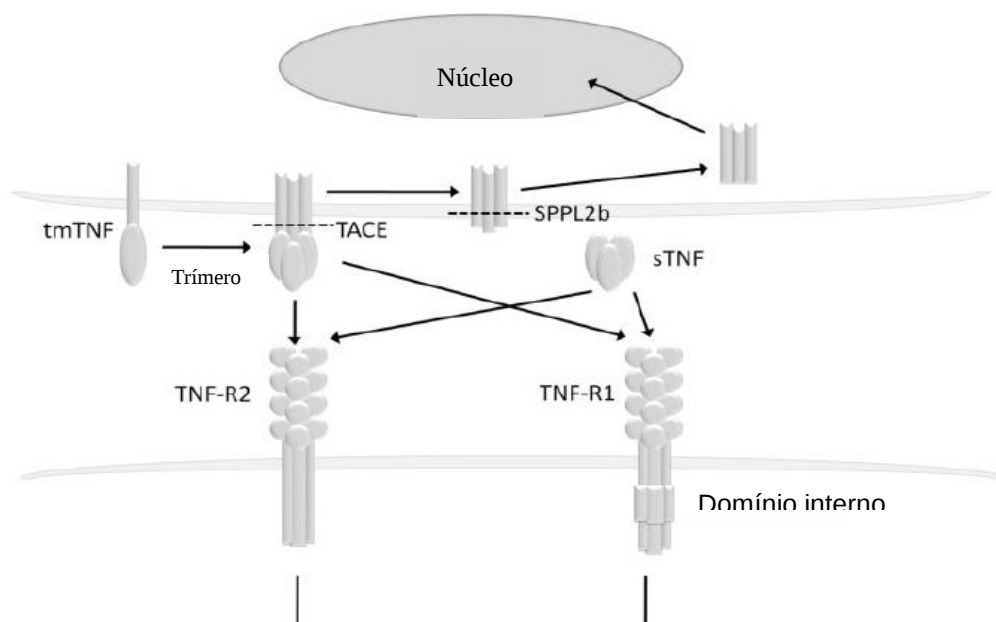
O TNF $\alpha$  é uma citocina pleiotrópica produzida por muitos tipos de células, incluindo macrófagos, monócitos, linfócitos, queratinócitos e fibroblastos, em resposta à inflamação, lesão e outros desafios ambientais, sendo sua função biológica mais importante à defesa contra infecções bacterianas, virais e parasitárias (Baud & Karin, 2001; Bradley, 2008). Ele não é apenas uma citocina proinflamatória potente, mas também desempenha um papel importante na ativação e migração de linfócitos e leucócitos, febre, resposta de fase aguda, proliferação celular, diferenciação e apoptose (Xanthoulea et al., 2004). O seu gene está localizado no cromossomo 6p21.3, dentro da região do MHC classe III (Figura 4) (Constantin et al., 2002).



**Figura 4:** Localização do gene *TNF $\alpha$*  no cromossomo 6 Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/TNF.jpeg>

A proteína é gerada como uma forma precursora chamada *TNF $\alpha$*  transmembranar que é expresso como um polipeptídeo de tipo II de superfície celular que consiste em 233 resíduos de aminoácidos (26 kDa) em macrófagos e linfócitos ativados, bem como em outros tipos de células (Pennica et al., 1984; Luetliq et al., 1989).

Depois de ser processado por metaloproteinases como a enzima de conversão *TNF $\alpha$*  (TACE) entre os resíduos de alanina<sup>76</sup> e valina<sup>77</sup>, a forma solúvel de 157 resíduos de aminoácidos (17 kDa) é liberado e medeia suas atividades biológicas através dos Receptores Tipo 1(TNFR1) e 2 (TNFR2) de TNF.(Bazzoni & Beutler, 1996; Black et al., 1997; Moss et al., 1997) . (Figura 5)



Apoptose, proliferação celular, produção de citocinas

**Figura 5:** Processamento e ativação da via de sinalização de  $\text{TNF}\alpha$ . Adaptado de Horiuchi et al, 2010

As vias de transdução de sinal de do  $\text{TNF}\alpha$  são complexas e ainda não totalmente compreendidas. A regulação do fator de transcrição  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  é um componente chave da transdução de sinal do  $\text{TNF}\alpha$ , mas o mapeamento físico em grande escala, em combinação com a análise de perda de função por RNA de interferência identificou 221 associações moleculares e 80 interagentes anteriormente desconhecidos envolvidos na modulação do  $\text{TNF-NF-}\kappa\text{B}$  (Bouwmeester et al., 2004). Todas as respostas conhecidas do  $\text{TNF}$  são desencadeadas pela sua ligação a um dos dois receptores,  $\text{TNFR1}$  e  $\text{TNFR2}$ , que são regulados diferencialmente em vários tipos de células em tecido saudável ou doente (Al-Lamki et al., 2001).

A utilização de diferentes mecanismos de sinalização por  $\text{TNFR1}$  e  $\text{TNFR2}$  é consistente com a capacidade de cada receptor para sinalizar respostas biológicas distintas em células de cultura. A ligação no  $\text{TNFR1}$  é necessário e suficiente para induzir efeitos citotóxicos e respostas pró-inflamatórias do  $\text{TNF}$ ,

enquanto TNFR2 pode promover a ativação celular, migração ou proliferação (Bradley, 2008). Sob certas circunstâncias, TNFR2 pode contribuir para respostas TNFR1, especialmente em baixas concentrações de TNF (Slowik et al., 1993), de acordo com a noção de "troca de passagem", em que TNFR2 captura TNF e passa para TNFR1 (Tartaglia et al., 1993).

Em resposta ao  $\text{TNF}\alpha$ , células endoteliais promovem a inflamação, expressando em um distinto padrão temporal e espacial (Messadi et al., 1987; Bradley, 1996), diferentes combinações de moléculas de adesão de leucócitos, incluindo E-selectina, molécula intracelular de adesão (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) (Pober et al., 1986; Munro et al. 1989). Além disso, muitas das características clássicas da inflamação podem ser produzidas por efeitos locais do TNF sobre as células endoteliais. Expressão induzida por  $\text{TNF}\alpha$  da ciclooxygenase 2 pode aumentar a produção de  $\text{PGI}_2$  resultando em vasodilatação e causando 'rubor' e 'calor' através do aumento do fluxo sanguíneo local (Mark et al., 2001).

O edema pode resultar de um aumento da permeabilidade vascular mediado por  $\text{TNF}\alpha$ , permitindo o aumento da passagem trans endotelial dos fluidos e macromoléculas que acabam criando o edema. Além disso, a expressão induzida por TNF de proteínas pró-coagulantes e a regulação negativa da proteína anticoagulante, tal como a trombomodulina, pode causar trombose intravascular (Bevilacqua et al., 1986).

## **2.6 Interleucina 2 (IL2)**

A interleucina-2 (IL2), anteriormente referida como fator de crescimento de células T (TCGF), é uma poderosa linfocina imunorreguladora que é produzida

pelas células T ativadas por lectina ou antígeno. É produzida não só por linfócitos T maduros na estimulação, mas também constitutivamente por certas linhagens de células T linfóides. É útil no estudo da natureza molecular da diferenciação das células T e, como interferon, aumenta a atividade de células NK (Lowenthal et al, 1985;. Smith, 1988).

A IL2 é uma citocina com peso molecular de 15 kDa, essencial na regulação da resposta imune (Andrade & Bastos, 1995; Malek, 2003; Pyo et al., 2003). Está envolvida na ativação, crescimento e diferenciação das células T, assim como na indução do crescimento, diferenciação e ativação funcional de uma variedade de outras células que participam da resposta imune (Giugno et al., 2004), como, ativação de células B, estimulação de macrófagos e células NK (Barros et al., 2006).

O gene da IL2 humano foi clonado primeiramente em 1983 (Taniguchi et al., 1983) e neste mesmo ano um grupo de pesquisa japonês descobriu que o gene *IL2* tem uma sequência homóloga ao promotor do gene *INF $\gamma$*  humano (Fujita et al., 1983). Usando um gene TCGF humano clonado em estudos de hibridação de células somáticas, Seigel et al. (1984) encontraram o locus TCGF no cromossomo 4 e, após a hibridização *in situ*, estreitou a localização para 4q26-q28 (Figura 6).



**Figura 6:** Localização do gene *IL2* no cromossomo 4. Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/IL2>.

Ativação de células T através de receptor de células T e moléculas co-estimulatórias como CD28 causa a produção de IL2 e a expressão do seu receptor (IL-2R). A interação da IL-2/IL-2R impulsiona a expansão clonal extensiva e desenvolvimento de efetores. Este modelo coloca a IL2 como nó central para células T dependente em respostas imunes (Malek, 2008). Ferlazzo et al. (2004) hipotetizou que a IL2 pode mobilizar células NK de tecidos linfóides secundários para mediar a eliminação de patógenos durante as respostas imunes. Eles também mostraram que as células NK isoladas de tecidos linfóides produzem IFN $\gamma$  após a ativação por IL2 e IL12, sugerindo assim, que os órgãos linfóides secundários são possíveis locais de diferenciação de células NK e de aquisição de autotolerância.

O receptor da IL2 (IL-2R) é composto por três subunidades, uma cadeia  $\alpha$  que funciona somente para a IL2 (obrigatória), e as subunidades  $\beta$  e  $\gamma$ , que funcionam para aumentar a ligação da interleucina e induzir a sinalização celular (Malek, 2003). A IL2 se liga a receptores específicos na superfície celular que são compostos por três cadeias de polipeptídeos IL-2R codificadas por três genes independentes: a IL-2R $\alpha$  (Leonard et al., 1984; Nikaido et al., 1984) IL-2R $\rho$  (Sharon et al., 1986; Tsudo et al., 1986), e uma proteína inicialmente chamada IL-2R $\gamma$  (Takeshita et al., 1992), mas agora conhecida como cadeia receptora comum de citocina  $\gamma$  ( $\gamma_c$ ) (Leonard, 1996).

## **2.7 Interleucina 12 (IL12)**

A Interleucina-12 (IL12) foi descoberta independentemente por Trinchieri et al. (1989) e Gately et al. (1990) como "fator estimulador de células NK" e como "fator de maturação de linfócitos citotóxicos", respectivamente. Entre o vasto leque de citocinas bioativas, a família da IL12 é única. Esta é a única família de citocinas heterodiméricas, o que lhes confere várias características únicas e distintivas. Cadeia de emparelhamento promíscua é uma característica comum desta família de citocinas heterodiméricas, que atualmente inclui IL12, IL23, IL27 e IL35 (Collison & Vignali, 2008; Jones. & Vignali, 2011).

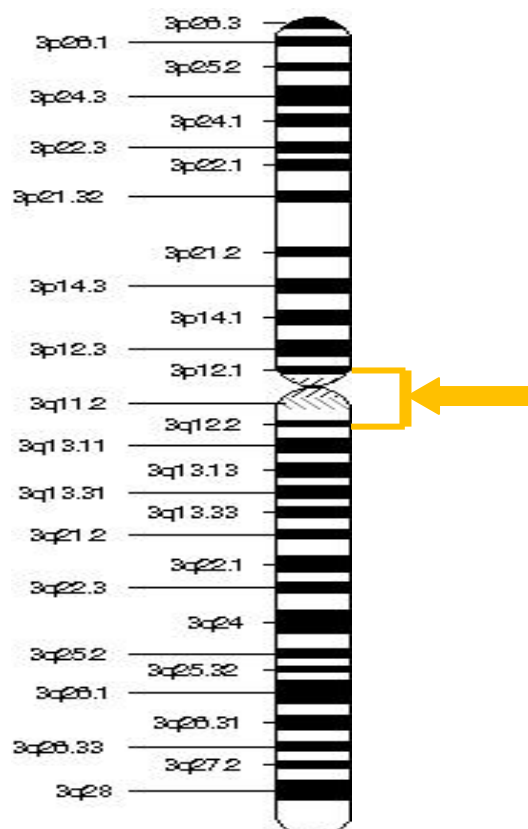
As citocinas heterodiméricas da família da IL12 consistem de uma cadeia  $\alpha$  (p19, p28 ou p35) e uma cadeia  $\beta$  (p40 ou Ebi3) (Collison & Vignali, 2008; Jones & Vignali, 2011). As cadeias  $\alpha$  tem uma estrutura de feixe de quatro hélices característica da superfamília IL6, a qual a família IL12 pertence. Em contraste, as cadeias  $\beta$  possuem homologia com cadeias de receptor de citocinas classe I, tais

como IL-6Ra (Kobayashi et al., 1989; Oppmann et al., 2000; Collison et al., 2007; Niedbala et al., 2007).

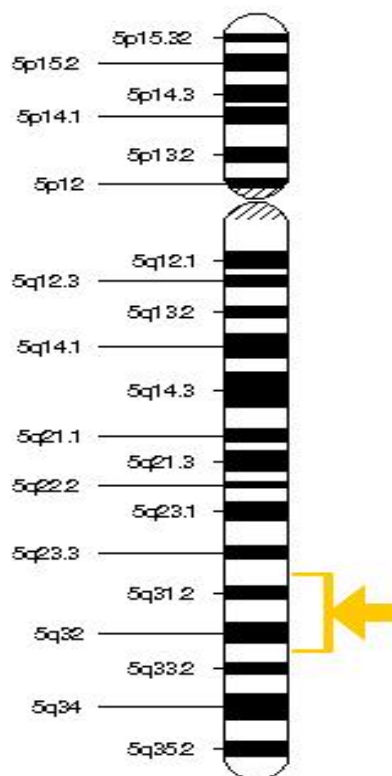
IL12 é um heterodímero constituído por uma cadeia leve de 35 kDa (conhecida como p35 ou IL-12R $\alpha$ ) e uma cadeia pesada de 40 kDa (conhecida como p40 ou IL-12 $\beta$ ) (Kobayashi et al., 1989). A subunidade p35 é codificada pelo gene *IL12A* enquanto que a subunidade p40 é codificada pelo gene *IL12B* que estão localizados nos cromossomos 3 (3p12-q13.2) (Figura 7) e 5 (5q31-q33) (Figura 8), respectivamente (Chen et al., 2009; Huang et al., 2011) sendo genes que podem ser regulados de forma independente (Müller-Berghaus et al., 2004).

A expressão e ligação de ambas as subunidades constitui a forma biologicamente ativa, a IL12 p70 (Trinchieri, 2003). IL12A, ou p35, é uma subunidade em duas citocinas heterodiméricas distintas: a IL12 e a IL35 (Wolf et al., 1994). A subunidade p40 da IL12, ou IL12B, heterodimeriza com a subunidade p35 da IL12 (IL12A) para formar a IL12 e com a subunidade p19 da IL23 (IL23A) para formar IL23 (Figura 9). Além disso, a IL12 p40 existe como um monômero e um homodímero (IL12 p80) (Gunsten et al., 2008) (figura 10).

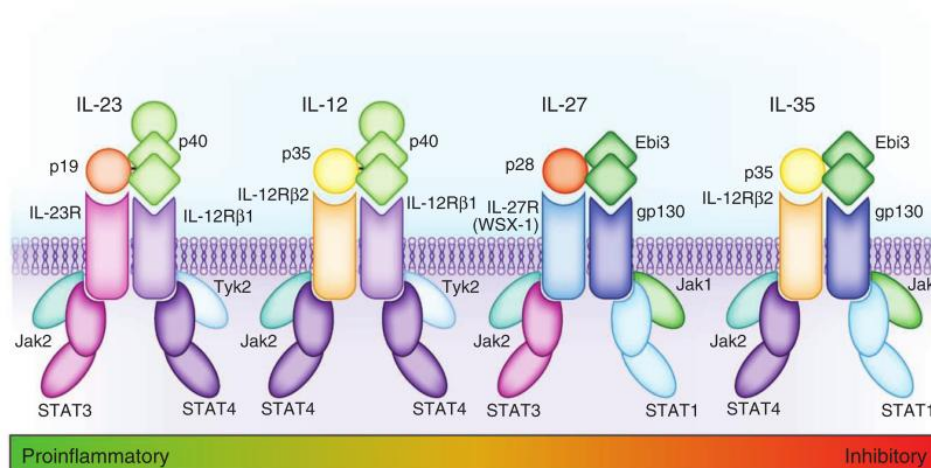
A IL12 p70 parece ser o protótipo de polarização da citocina Th1 capaz de estimular células T naive e induzir a secreção de INF $\gamma$  (MÜLLER-BERGHAUS et al., 2004). Tem sido demonstrado que a expressão da IL12B é muito mais regulada do que a IL12A, embora a expressão das duas subunidades seja regulada pela ativação de células produtoras de IL12. Assim, a secreção da IL12 p70, parece ser predominantemente regulada ao nível transcricional da IL12B (Tsunemi et al., 2002).



**Figura 7:** Localização do gene *IL12A* no cromossomo 3. Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/chromosome/3>



**Figura 8:** Localização do gene *IL12B* no cromossomo 5. Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/IL12B>



**Figura 9:** Estrutura das interleucinas da Família IL12 e seus respectivos receptores. Adaptado de Vignali & Kuchroo, 2012

A IL12 é produzida por vários tipos de células, incluindo macrófagos, granulócitos neutrofílicos e CDs que mostram ser a principal fonte da interleucina. O receptor de IL12 é composto por duas cadeias, a IL-12R $\beta$ 1 e a IL-12R $\beta$ 2 (Presky et al., 1996) que ativam a via Janus quinase (JAK)-STAT de transdução de sinal. Os efeitos celulares específicos de IL12 são devidos principalmente à ativação de STAT4, tal como indicado pelo fato de que ratos geneticamente deficientes para STAT4 tem um fenótipo idêntico a ratos que são deficientes para a subunidade p40 da IL12 (Kaplan et al., 1996; Thierfelder et al., 1996). IL-12R é expresso principalmente pelas células T ativadas e células NK (Presky et al., 1996).

## 2.8 A Citocina IL-23 e o Gene IL23R

A IL23 é expressa principalmente por células dendríticas apresentadoras de antígenos e macrófagos. Ela é reconhecida por estimular a proliferação e

manutenção de células Th17, estimuladas inicialmente por TGF- $\beta$ , IL6 e IL22(Xu et al.2010).

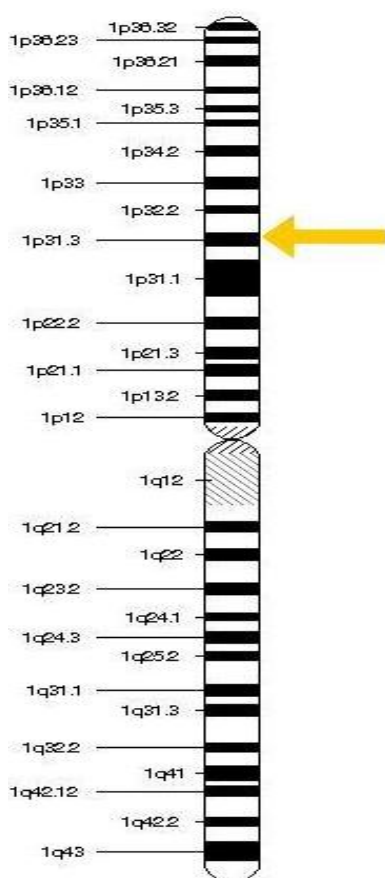
Apesar das muitas semelhanças estruturais das citocinas e os seus receptores e componentes de sinalização a *downstream* da família IL12, elas têm diferentes atividades biológicas que mostram suas características diferentes. IL12 e IL23 são principalmente citocinas pró-inflamatórias e pró-estimulatórias com papéis chave no desenvolvimento dos subconjuntos Th1 e Th17 de células T respectivamente (Langrish et al., 2004; Hunter 2005; Kastelein et al., 2007).

Pelo fato de trabalhos iniciais mostrarem que a IL23 está associada com o aumento da produção de IFN $\gamma$  pelas células T CD4 +, fazia sentido associá-la com a via de resposta Th1 (Murphy et al., 2002; Robinson& O'Garra, 2002). No entanto, estudos recentes revelaram que estas novas proteínas tem um papel limitado na promoção da imunidade mediada pelas células clássicas (Th1 e Th2). Sua capacidade é mais associada em estimular as células T CD4<sup>+</sup> em produzir IL17 que tem um papel dominante no desenvolvimento e na manutenção da inflamação autoimune (Vignali &Kuchroo, 2012).

Embora a IL12 permaneça sendo a citocina heterodimérica prototípica, estudos não tão recentes descreveram outros heterodímeros relacionados. Em 2000, Oppmann e seus colaboradores identificaram a molécula p19 (IL-23p19), em uma pesquisa de homologia para os membros da família IL6. Suas pesquisas revelaram que p19 dimeriza com IL-12p40 e que esta citocina, conhecida como IL23, usa IL-12R $\beta$ 1, mas não IL-12R $\beta$ 2 como se componente receptor de alta afinidade (Oppmann et al., 2000). A clonagem funcional da outra subunidade do receptor para IL23, uma subunidade conhecida como IL23R, mostrou que o mRNA que codifica esta cadeia está presente em células T e células NK, e que a

ativação de células T, independentemente das condições de polarização, é associada com aumento da expressão de mRNA que codifica a subunidade para este receptor (Parham et al., 2002).

Por análise da sequência genômica, o gene IL23R foi mapeado no cromossomo 1p32.1-p31.2, a cerca de 150 kb do gene IL12R $\beta$ 2, possuindo um total de 11 éxons (Parham et al., 2002; Yu & Gallagher, 2010) (Figura 10).



**Figura 10:** Localização do gene *IL23R* no cromossomo 1 Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/IL23R>

Por análise de PCR em bibliotecas de cDNA de linhagens de células T que respondem a IL23, Parham et al. (2002) identificaram um cDNA de 2.9-kb que codifica a IL23R. Foi predita uma proteína transmembrana com 629 aminoácidos (que mostra alguma homologia com IL12R $\beta$ 2), que contém uma sequência sinal, um domínio N-terminal tipo IG, dois domínios de receptores de citocina, sete

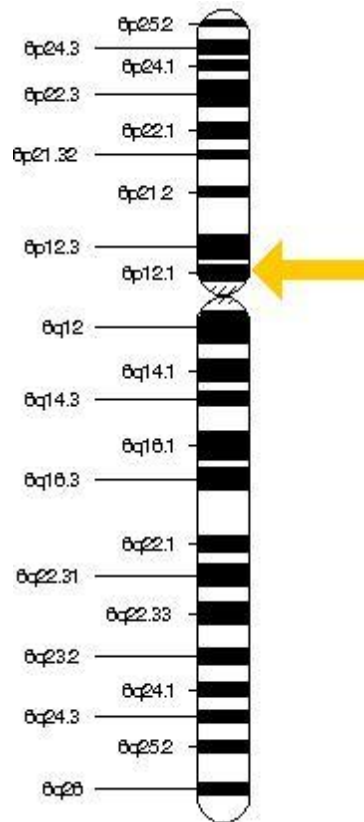
potenciais sítios de glicosilação, um motivo WQPWS no domínio transmembrana e um domínio citoplasmático de 252 resíduos com 6 resíduos de tirosina conservados e uma tirosina adicional na posição 463 (figura 9).

Células T *naïve* expressam IL-12R $\beta$ 1 e gp130, mas não de IL-12R $\beta$ 2, IL-23R ou IL-27R (WSX-1) (Szabo et al., 1995; Szabo et al., 1997; Rogge et al., 1997). A sinalização através do receptor de antígeno das células T não é suficiente para induzir a expressão de IL-23R. As citocinas que induzem a ativação do fator de transcrição STAT3 são os indutores mais potentes de expressão de IL-23R. STAT3 e o fator de transcrição ROR $\gamma$ t agem em conjunto para transativar a IL23 e IL-23R, facilitando desse modo uma retro alimentação positiva que aumenta a expressão de IL-23R, IL-17 e IL-22 e estabiliza o fenótipo Th17 (Vignali & Kuchroo, 2012).

## **2.9 Interleucina 17A (IL17A) e Interleucina 17F (IL17F)**

A família IL17 é a mais recente descoberta das famílias de citocinas, com a descoberta da IL17A, inicialmente denominada de antígeno de linfócito T citotóxico 8 (CTLA8) e o seu componente mais recente descoberto em 2001 e denominado como IL-17F, sendo a primeira vez citada em 1993 por Ransier e colaboradores. (Kawaguchi et al., 2009; Onishi & Gaffen, 2010; Paradowska-Gorycka et al., 2010).

As citocinas IL17A e IL17F apresentam cerca de 50% de homologia e são codificadas por genes muito próximos que estão localizados no cromossomo 6p12 (figura 11), podendo se apresentar na forma homodimérica, ou constituindo um composto heterodimérico IL17A/F (Ishigame et al., 2009; Chang et al., 2010; Wang et al., 2012).



**Figura 11:** Localização dos genes *IL17A* e *IL17F* no cromossomo 6. Fonte: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/IL17F>

Tanto a *IL17A* quanto a *IL17F* facilmente formam homodímeros, no entanto, evidências sugerem que um heterodímero *IL17A/IL17F* pode ser formado. Assim a *IL17A*, *IL17F* e o heterodímero *IL17A/IL17F* ligam-se respectivamente aos receptores *IL-17RA*, *IL-17RC* e *IL-17RA/IL-17RC* que são ubiquamente expressos (Chang & Dong, 2007; Kuestner et al., 2007; Wright et al., 2007; Chang & Dong, 2009; Gaffen, 2009). As citocinas *IL17A* e *IL17F* utilizam os adaptadores *TRAF6* e *Act1* nas suas vias de sinalização de transdução de sinal (Chang et al., 2006; Qian et al., 2007). Ambos *IL17A* e *IL17F* facilmente ativam células residentes e inatas dos tecidos, tais como fibroblastos e as células epiteliais, para induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Martinez et al., 2008). Apesar de utilizarem os mesmos receptores, o *IL17RA* e o

IL17RC, elas possuem atividades biológicas distintas, sendo a IL17A cerca de 10 vezes mais potente na produção de quimiocinas (Dubin et al., 2009).

Além disso, outras citocinas pró-inflamatórias, como o  $\text{TNF}\alpha$ , têm sido associadas em trabalhar sinergicamente com a IL17A, para aumentar a atividade das células inflamatórias inatas (Ruddy et al., 2004; Shen et al., 2005). Em geral, um dos principais resultados atribuídos ao aumento da produção de IL17A e IL17F é o recrutamento e ativação de neutrófilos durante a inflamação (Dong, 2009). Tem sido observado que IL17A induz outras citocinas pró-inflamatórias como IL6, IL21 e IL22, quimiocinas e proteínas inflamatórias de fase aguda (Mckenzie et al., 2006).

A IL17F induz a expressão de  $\text{TGF-}\beta$  e inibe a angiogênese de células endoteliais, mas não tem nenhum efeito sobre a hematopoiese ou migração dos linfócitos. Assim a IL17F pode ter um papel regular a resposta imune geral regulando a expressão de citocinas críticas que têm muito mais efeitos estimulantes (Starnes et al., 2001).

As IL17A e IL17F são produzidas principalmente pelas células T ativadas e desempenham papéis importantes na resposta imune contra certas bactérias e fungos (Korn et al. 2009). Células produtoras de IL17 têm sido implicadas na patogênese de várias doenças autoimunes, incluindo esclerose múltipla e lúpus (Korn et al. 2009; Nalbandian et al., 2009).

## **2.10 As interleucinas e seus papéis na autoimunidade**

### **2.10.1 O papel do $\text{TNF}\alpha$ na autoimunidade**

O  $\text{TNF}\alpha$  não é geralmente detectável em indivíduos saudáveis, mas os níveis séricos e teciduais elevados são encontrados em condições inflamatórias e

infecciosas (Nurnberger et al., 1995; Robak et al., 1998), estando os níveis séricos correlacionados com a gravidade das infecções (Waage et al., 1987; Kwiatkowski et al., 1990).

Entre os vários polimorfismos descritos na região promotora do gene do *TNF $\alpha$* , a variante genética TNF1 na posição -308 (G) mostrou efeito funcional sobre a atividade transcricional do gene sendo observado que, o alelo incomum *TNF2* na posição -308 (A) apresenta uma atividade transcricional mais forte que o -308 (G) depois da estimulação de linfócitos *in vitro* (Kroeger et al., 2000). Níveis de *TNF $\alpha$*  são aumentados em pacientes com LES, assim como em parentes de primeiro grau de indivíduos acometidos por esta patologia quanto comparados a indivíduos saudáveis sem histórico familiar, além de se associar fortemente com os parâmetros da atividade da doença (Studnicka-Benke et al., 1996; Mangale et al., 2013).

As manifestações do LES estão associadas com diferenças na capacidade de produção de *TNF $\alpha$* , e tem sido sugerido que elementos polimórficos dentro da região do HLA classe II determinam a capacidade de produção do *TNF $\alpha$* . Vários estudos têm analisado a associação entre o polimorfismo -308 (G/A) do gene *TNF $\alpha$*  e o desenvolvimento do lúpus, e mostram resultados inconclusivos (Lee et al., 2006; Guarnizo-Zuccardi et al., 2007; Jiménez-Morales et al., 2009).

### **2.10.2 O papel da IL2 na autoimunidade**

Polimorfismos dentro dos genes que codificam as duas subunidades diferentes do receptor, IL-2R $\alpha$  e IL-2R $\beta$  têm sido associados com uma grande predisposição a diabetes tipo I, artrite reumatoide e esclerose múltipla. Associação de polimorfismos nos genes da IL2, IL-2RA e IL-2RB com múltiplas

doenças autoimunes sugerem um mecanismo comum em sua patogênese (Cavanillas et al., 2010).

John e colaboradores (1998) identificaram dois SNPs no gene *IL2*, um na posição -330 e outro na posição +166. A substituição de timina (T) por guanina (G) na posição -330 do gene *IL2* foi relatada estar associada com precoce e intensa produção de IL2, sendo o genótipo resultante, chamado alto produtor na doença de enxerto contra o hospedeiro (DECH) e a presença de ao menos um alelo G nesta posição, foi associada a um risco dobrado dos indivíduos desenvolverem a DECH (Vizoni et al., 2008). Este SNP foi reportado resultar num aumento de três vezes na produção desta proteína em indivíduos homozigotos GG quando comparados àqueles com genótipo homozigoto TT, e associado a doenças autoimunes como Beçet (Shahram et al., 2011), doença de Crohn e Trombocitopenia crônica imune (Rocha et al., 2010).

A importância da IL2 como uma citocina chave para a ativação de células T e função imunológica tem amplo suporte experimental (Ma et al., 2006). Ela desempenha um papel como um fator de crescimento autólogo e parácrino entre as primeiras 48 a 72 horas de ativação das células T. Paradoxalmente, a sua ausência tem sido associada ao desenvolvimento de autoimunidade letal em camundongos (Ma et al., 2006), e o fracasso para produzir quantidades normais de IL2 após a ativação é considerado um marco de células T de pacientes com LES (Crispín & Tsokos, 2008). Uma das consequências da diminuição da produção de IL2 é uma redução no número de células Treg nestes pacientes, uma vez que as células Treg controlam a expressão de células T auto-reativas e, portanto, são importantes na inibição da autoimunidade (El-Shafey et al., 2008; Lieberman & Tsokos, 2010).

### **2.10.3 O papel da IL12 na autoimunidade**

Dada à importância da subunidade p40, no sistema imunológico, é possível que variantes genéticas de IL12B possam ser importantes por causar anormalidades imunológicas, resultando na persistência ou infecção viral (Han et al., 2008).

Foram relatados polimorfismos na região promotora, na região codificadora (íntron 2, íntron 4, éxon 5) e na região 3'UTR do gene da IL12B com efeito sobre a expressão do RNAm da IL12B e o nível de expressão da IL12 p70 (Tsunemi et al., 2002; Tso et al., 2004; Morahan et al., 2007; Han et al., 2008). Estes polimorfismos têm sido correlacionados ao aumento da secreção desta citocina em várias doenças autoimunes e inflamatórias, como a psoríase, esclerose múltipla, diabetes tipo I, asma severa, artrite reumatóide e asma atópica (Hall et al., 2000; Tsunemi et al., 2002; Han et al., 2008; Chen et al., 2011). Além disso, um estudo recente mostra a associação entre o polimorfismo 3'UTR +1188 (A/C) com o desenvolvimento do Lúpus (Metiva et al., 2012). Sánchez et al. (2005) verificaram uma produção excessiva de IL12 em pacientes com LES e sugeriram que este aumento esteja relacionado com a presença de variações na regulação da expressão do gene *IL12B*.

### **2.10.4 O papel da IL-23R na autoimunidade**

Por citometria de fluxo e análise de imuno histoquímica, Tonel e colaboradores (2010) demonstraram que a expressão de IL23 e IL23R foi aumentada em tecidos de pacientes com psoríase. A injeção de um anticorpo monoclonal contra IL23 num modelo de xenotransplante em rato mostrou uma dependência da inibição da psoríase pela inibição da IL23 comparáveis aos

resultados obtidos com o anti-TNF (Leonardi et al., 2003). Tonel e colaboradores (2010) concluíram que a via IL23 tem um papel crucial na patogênese da psoríase.

Usando células de sangue periférico estimuladas por lipopolissacarídeo de 6 indivíduos heterozigóticos para o SNP 2199(A/C) do gene *IL23R* (rs10889677) e um ensaio de específico para SNP, Zwiers e colaboradores (2012) mostraram que o alelo A produz significativamente mais mRNA de *IL23R* do que o alelo C. Análise de Western Blot mostrou que os indivíduos homozigotos AA também produziram significativamente mais *IL23R* do que homozigotos CC. Zwiers e cols (2012) propuseram que o rs10889677 está associado à susceptibilidade a doença imune do intestino e afeta a funcionalidade do gene de *IL23R* alterando sua regulação. Estudos mostram que o polimorfismo está associado a outras doenças como Artrite Reumatóide, Doença de Crohn (Faragó et al., 2008) e doença de Grave (Huber et al., 2008). Por outro lado estudos mostram a falta de associação deste polimorfismo com o desenvolvimento do Lúpus (Chen et al., 2013; Safrani et al., 2010).

#### **2.10.5 O papel da 17A e IL17F na autoimunidade**

A produção elevada desta interleucina tem sido associada à patogênese de várias doenças autoimunes como psoríase, artrite reumatoide (Van Bezooijen et al., 1999; Miossec, 2003), doença inflamatória do intestino (Shih et al., 2008) e Lúpus Eritematoso (Crispin et al., 2008; Wong et al., 2008).

Os soros de pacientes com lúpus contêm níveis anormalmente elevados de IL17 (Doreau et al., 2009) e uma grande fração de células CD4<sup>+</sup> e células T CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> (duplos negativos) destes pacientes produzem IL17, Além disso, IL-17

produtoras de células T têm sido encontrados com infiltrados nos rins de pacientes com nefrite (Crispin et al., 2008).

O aumento da produção de IL17A em pacientes com LES correlaciona-se com a atividade da doença (Yang et al., 2009). A excreção de IL17A amplifica a resposta inflamatória, recrutando células efectoras de órgãos alvo. Além disso, IL17A contribui para a formação de centros germinais e, agindo em conjunto com um ativador de fator de células B, aumenta a sobrevivência e proliferação de células B e a sua transformação em células secretoras de anticorpos (Yang et al., 2009).

Assim, a partir do que foi descrito, fica evidente o importante papel das interleucinas, e de alguns polimorfismos presentes em seus genes, no desenvolvimento de doenças autoimunes, em especial, o Lúpus Eritematoso Sistêmico. Pelo fato de o LES ser multifatorial e com uma patogênese ainda incerta, tornam-se necessários estudos que tragam novos conhecimentos acerca do papel de polimorfismos em genes de interleucinas com a doença, o que poderá servir de base para novos métodos diagnósticos, assim como, indicar novos alvos para seu tratamento.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Geral

Avaliar a associação entre polimorfismos nos genes de interleucinas e seus receptores com o desenvolvimento do Lúpus Eritematoso Sistêmico, com a atividade da doença e com as manifestações clínicas desenvolvidas em mulheres acometidas por esta patologia no estado de Pernambuco.

#### 3.2 Específicos

1. Verificar a associação entre os SNP's IL2 -330 (T/G) (rs2069762), *IL12* 3'UTR +1188 (A/C) (rs3212227), *IL17A* -197(G/A) (rs2275913), *IL17F* +7488 (A/G) (rs763780), *IL23R* +2199 (A/C) (rs10889677) e TNF $\alpha$  -308 (G/A) (rs1800629) e o desenvolvimento do Lupus;
2. Verificar a associação entre polimorfismos dos genes IL2, *IL12*, *IL17A*, *IL17F*, *IL23R* e TNF $\alpha$  com o nível de atividade da doença;
3. Verificar a associação entre polimorfismos dos genes IL2, *IL12*, *IL17A*, *IL17F*, *IL23* e TNF $\alpha$  com características clínicas apresentadas pelos pacientes.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1 Desenho:**

Estudo analítico de corte transversal com comparação de grupos.

### **4.2 Critérios de inclusão:**

Adultos com diagnóstico confirmado, em tratamento ou fora de tratamento em regime ambulatorial.

### **4.3 Critérios de exclusão**

Pacientes diagnosticados com alguma doença autoimune que não Lúpus Eritematoso Sistêmico.

### **4.4 Estratégia de seleção de casos e controles:**

Os casos foram selecionados a partir de análise de prontuário de pacientes atendidos no Ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas-UFPE entre janeiro de 2009 a abril de 2010, e que tiveram a confirmação do diagnóstico clínico de acordo com os critérios da Academia Americana de Reumatologia, perfazendo um total de 122 mulheres. Os controles foram mulheres adultas saudáveis, doadoras de sangue e sem histórico familiar de LES, coletadas do banco de amostras do Laboratório GENOMA-UFRPE, sendo um total de 125 mulheres.

## **4.5 Material biológico**

O DNA foi extraído pelo kit Wizard Genomics, seguindo as especificações do fabricante (PROMEGA), a partir de sangue periférico coletado em tubo com EDTA e posteriormente armazenado a -20<sup>0</sup> C.

## **4.6 Aspectos clínicos e determinação da atividade do lúpus**

A prevalência dos dados clínicos foi obtida através da análise dos prontuários das pacientes. A atividade da doença foi avaliada de acordo com o Índice de Atividade do Lúpus Eritematoso Sistêmico (SLEDAI Modificado 2k) (Uribe, et al., 2004) para todas as pacientes. Três estágios foram considerados de acordo com o score do SLEDAI: LE inativo (SLEDAI=0), LE leve/moderado (SLEDAI entre 1-7) e LE severo (SLEDAI≥8). Esta avaliação foi realizada, de forma colaborativa, pela Dr<sup>a</sup> Nadja Asano, médica reumatologista do Hospital das Clínicas/PE.

## **4.7 Seleção de genes**

Os genes e seus respectivos polimorfismos foram selecionados a partir de revisão da literatura.

## **4.8 Identificação dos polimorfismos das interleucinas.**

### **4.8.1 Genotipagem do SNP TNF $\alpha$ -308 (G/A) (Cabrera et al., 1995)**

A genotipagem da região TNF $\alpha$  (-308 G/A) foi realizada por PCR-RFLP sendo o primer direto 5'- AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3 e o reverso 5'- TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3. O volume final da reação consistiu de 15 $\mu$ l,

contendo: 50-200ng de DNA, 1X Master Mix GoTaq® Hot Start DNA polimerase (PROMEGA), 1pmol/μL de cada primer e água deionizada.

As condições de ciclagem foram 94°C por 3min, seguidos por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 52°C por 1 min e 72°C por 1 min e uma temperatura final de 72°C por 10min. A verificação da amplificação foi feita em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. O tamanho do amplicom do gene TNF $\alpha$  é de 107pb.

Para detecção do SNP, foi realizada uma digestão com a enzima NcoI. O Mix da reação teve um volume final de reação de 10μL, no qual 8 μL foi do material amplificado, 1,85μL de tampão BSA e 0,15μL da enzima, 3U por reação. A reação foi incubada a 65°C por 4h. A genotipagem foi realizada em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio, no qual amostras de indivíduos homozigotos recessivos (AA) apresentaram um fragmento (107), indivíduos heterozigotos (GA), 3 fragmentos (107, 87 e 20pb) e indivíduos homozigotos dominantes (GG) dois fragmentos (87 e 20pb).

#### **4.8.2 Genotipagem do SNP -330 (T/G) do gene *IL2* (Franceschi et al., 2009)**

A genotipagem da região -330 (T/G) do gene *IL2* foi realizada através da PCR alelo específica e baseou-se em um conjunto de quatro primers P1: 5'TGAAACAGGAAACCAATACACT-3'; GR:5'-AACTCAGAAAATTTTCTTAGTCC-3'; P5:5'CAAGACTTAGTGCAATGCAAG-3' e TF:5'TCACATGTTTCAGTGTAGTATTAT-3'. O volume final da reação consistiu de 15μl, contendo: 50-200ng de DNA, 1X Master Mix GoTaq® Hot Start DNA polimerase (PROMEGA), 1pmol/μL de cada primer e água deionizada. As condições de ciclagem foram 96°C por 2min, seguidos um ciclo de 63°C por

60seg, 9 ciclos de 96°C por 10seg, 63°C por 60seg e 72°C por 30seg, vinte ciclos de 96°C por 10seg, 59°C por 50seg, 72°C por 30seg com posterior refrigeração a 4°C.

O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio. Na presença da **Guanina** no sítio polimórfico do gene *IL2*, os primers P1 e GR produzem um produto de 143pb, enquanto que na presença de **Timina** os primers P5 e TF produzem um produto de 447pb. Em indivíduos heterozigotos geram-se os dois fragmentos.

#### **4.8.3 Genotipagem do SNP I 3'UTR +1188 (A/C) do gene *IL12B* (Huang et al., 2000)**

A amplificação da região 3'UTR +1188 (A/C) do gene *IL-12B* foi realizada por PCR-RFLP sendo o primer direto 5'-GATATCTTTGCTGTATTTGTATAGT-3' e o reverso 5'-AATATTTAAATAGCATGAAGGC-3'. O volume final da reação inicial consistiu de 20µL, sendo, 50-200ng de DNA, 1X de Master Mix PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1pmol/µL de cada primer e água Milli-q q.s.p.

As condições utilizadas na reação foram aquecimento inicial de 95°C por 5min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 45s, 53°C por 45s e 72°C por 45s e por fim o anelamento na temperatura de 72°C por 10min com posterior refrigeração a 4°C. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. O tamanho do amplicom específico do gene *IL-12B* esperado foi de 118 pb.

Para detecção do SNP, foi realizada uma digestão do material amplificado com a enzima *TaqI*. Para tal, utilizou-se um volume final da reação de 10µL. Contendo, 8 µL do material amplificado, 1,5µL de tampão BSA e 5U da enzima

*TaqI*. A reação foi incubada a 65°C por 4h. A genotipagem foi realizada em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio, no qual amostras de indivíduos homozigotos mutantes (CC) apresentaram dois fragmentos (92pb e 26pb), indivíduos heterozigotos (AC), 3 fragmentos (118pb, 92pb e 26pb) e um fragmento (118pb) para as amostras homozigotas dominantes (AA).

#### **4.8.4 Genotipagem do SNP IL23R +2199 (A/C) (Chen et al., 2010)**

A genotipagem da região *IL23R* +2199 foi realizada por PCR-RFLP sendo o primer direto 5'-AGGGGATTGCTGGGCCATAT-3' e o primer reverso 5'-TGTGCCTGTATGTGTGACCA-3'. Os reagentes utilizados na reação foram 200ng de DNA, 1.0mM de cada primer, 200mM de cada dNTP, 1X GoTaq Master Mix PCR (PROMEGA) e água deionizada para um volume final de 12,5 µL. As condições de ciclagem foram 95°C por 5 min, seguido por 38 ciclos de 95°C por 30 seg, 60°C por 45seg, 72°C por 60seg e uma extensão final da com um ciclo de 72°C por 10 minutos, com posterior acondicionamento da amostra a 4°C. O produto da amplificação foi digerido utilizando-se 5U da enzima *MnLI* (Fermentas) a 37°C overnight e visualizados em gel de agarose a 3%, corado com brometo de etídio. Foram obtidos três perfis de fragmentos: AA (215 bp), CC (154, 61 bp), AC (215, 154, 61 bp).

#### **4.8.5 Genotipagem dos SNPs IL17A -197(G/A) e IL17F +7488 (A/G) (Wu et al. 2009)**

A genotipagem da região *IL17A* +197 e *IL17F* +7488 foi realizada por PCR-RFLP sendo o primer direto 5'-AACAAGTAAGAATGAAAAGAGGACATGGT-3' e o reverso 5'-CCCCCAATGAGGTCATAGAAGAATC-3' para *IL17A* e direto 5'-ACCAAGGCTGCTCTGTTTCT-3' e reverso 5'-GGTAAGGAGTGGCATTCTTA-3'

para *IL17F*. O volume final da reação foi de 12,5µL, contendo 1X Master Mix PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), DNA com concentração entre 50-200ng, 1pmol/µl de cada primer e água deionizada. As condições de ciclagem foram 95°C por 5min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 45s, 60°C por 45s e 72°C por 45s e uma extensão final com um ciclo de 72°C por 10min.

Para detecção do SNP, foi realizada uma digestão com a enzima *EcoNI* para *IL17A* -197 e *NlaIII* para *IL17F* +7488. O Mix da reação para ambos teve um volume final da reação de 10µl, no qual 8 µl foi do material amplificado, 1,85µl de tampão BSA e 5U da enzima por reação. A reação foi incubada em banho seco a 37°C por 24h sendo genotipagem realizada em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio. Três tipos de fragmentos foram observados: para *IL17A* -197 → AA (102 bp), GG (68 e 34 bp) e AG (102, 68 e 34 bp) e para *IL17F* +7488 → GG (143 bp), AA (63 e 80 bp) e GA (143, 80 e 63bp).

## 4.9 Grupos amostrais

Na tabela a seguir, estão discriminados os grupos amostrais de pacientes e controles para cada polimorfismo:

**Tabela 2:** Grupos amostrais de pacientes e controles para os polimorfismos  $TNF\alpha$  -308 (G/A), *IL2* -330 (T/G), *IL12* 3'UTR +1188 (A/C), *IL17A* -197(G/A), *IL17F* +7488 (A/G) e *IL23R* +2199 (A/C)

| Polimorfismo                  | Pacientes | Controles |
|-------------------------------|-----------|-----------|
| $TNF\alpha$ -308(G/A)         | 98        | 76        |
| <i>IL2</i> -330(G/T)          | 98        | 76        |
| <i>IL12B</i> 3'UTR +1188(A/C) | 93        | 75        |
| <i>IL23R</i> +2199(A/C)       | 95        | 125       |
| <i>IL17A</i> -197(G/A)        | 118       | 120       |
| <i>IL17F</i> +7488(A/G)       | 118       | 120       |

#### **4.10 Análise dos dados**

A existência de associações entre variáveis categóricas foi realizada utilizando o teste de Qui-quadrado ou o Teste G de Williams, de acordo com o tamanho das amostras. A magnitude dessas associações foi estimada como *odds ratios* (OR) ou riscos relativos (RR), utilizando intervalos de confiança de 95%. Todos os testes foram de duas caudas e um valor de  $p$  menor que 0,05 foi indicativo de significância estatística. Para estas análises os programas Epi Info versão 7 (Dean et al., 2011) e Bioestat 5.0 foram utilizados.

#### **4.11 Aspectos éticos**

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco (protocolo 299/2008) (Anexo A) e todos os pacientes e controles assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (Anexo B).

## 5. Resultados

### 5.1 Dados Clínicos das Pacientes

O estudo avaliou mulheres diagnosticadas com lúpus, sendo 122 o total de mulheres no grupo de pacientes com uma média de idade de  $32.26 \pm 7.239$ , sendo a faixa etária entre 31 e 40 anos a mais frequente. Na análise das pacientes foi verificada a proporção de acometimento das características clínicas. Os dados estão apresentados na tabela 2.

**Tabela 3:** Prevalência das características clínicas nas pacientes acometidas por Lúpus Eritematoso Sistêmico.

| Variáveis                       | Pacientes<br>N= 122 |
|---------------------------------|---------------------|
| <b>Idade</b>                    | <b>n(%)</b>         |
| ≤ 30                            | 50 (40,98)          |
| De 31 a 40                      | 56(45,9)            |
| De 41 a 50                      | 17(13,12)           |
| <b>Características Clínicas</b> | <b>n(%)</b>         |
| Rash Malar                      | 119(97,54)          |
| FAN                             | 110(90,16)          |
| Artrite                         | 108(88,52)          |
| Fotosensibilidade               | 97(79,51)           |
| Desordens Renais                | 57(46,72)           |
| Desordens Hematológicas         | 53(43,44)           |
| Rash Discoide                   | 52(42,62)           |
| Úlcera Oral                     | 52(42,62)           |
| Desordens Imunológicas          | 41(33,61)           |
| Serosite                        | 37(30,33)           |
| Desordens Neurológicas          | 28(22,95)           |

### 5.2 Associação dos polimorfismos $TNF\alpha$ -308 (G/A), IL2 -330 (T/G), IL12 3'UTR +1188 (A/C), IL17A -197(G/A), IL17F +7488 (A/G) e IL23R +2199 (A/C) com o LES

Após a análise do polimorfismo -308 (G/A) gene  $TNF\alpha$  observou-se que, para o grupo controle, a distribuição genotípica apresentou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que não foi observado para o grupo dos pacientes. As frequências alélicas e genotípicas do SNP -308 (G/A) dos pacientes e controles

estão apresentados na Tabela 4. A distribuição de frequências dos genótipos foram significativamente diferentes entre os grupos ( $\chi^2=13,439$ ;  $p= 0,0012$ ). O alelo A foi mais prevalente no grupo caso que no grupo controle, e conferiu risco três vezes maior para o desenvolvimento de LES (OR = 3,3889;  $p=0,0009$ ).

Para os polimorfismos -197(G/A) do gene *IL17A* e +7488(A/G) do gene *IL17F*, as distribuições genóticas do grupo de pacientes e controles não se apresentaram de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Para o polimorfismo -197(G/A) do gene *IL17A*, foi observado que a distribuição de frequências dos genótipos foram significativamente diferentes entre o grupo de pacientes e controles ( $\chi^2= 11.617$ ;  $p= 0.0030$ ). O genótipo GA foi mais frequente no grupo dos pacientes do que no grupo dos controles e apresentou aproximadamente duas vezes mais risco no desenvolvimento do LES quando comparado como genótipo GG (OR= 2.0186;  $p=0.0165$ )(Tabela 4).

O polimorfismo +7488(A/G) do gene *IL17F* também mostrou associação com o desenvolvimento do lúpus. A distribuição genotípica foi significativamente diferente entre os grupos sendo o genótipo AG mais frequente entre os pacientes e genótipo AA entre os controles ( $\chi^2=16.758$ ;  $p=0.0002$ ). Indivíduos heterozigotos apresentaram três vezes mais chance de desenvolver lúpus (OR=3.1163;  $p=0.0008$ ) em relação aos indivíduos homozigotos selvagens (AA). A análise realizada pelo modelo dominante mostra que indivíduos carreadores do alelo G tem aproximadamente duas vezes e meia mais chance de desenvolver LES do que os indivíduos não portadores do alelo.

Para o polimorfismo da região -330(T/G) do gene *IL2*, as frequências genóticas apresentam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Houve diferença significativa na distribuição dos genótipos entre o grupo de pacientes e o grupo

controle, estando o genótipo TT em maior frequência na população de pacientes quando comparada a população controle ( $\chi^2= 11,837$ ;  $p=0,0006$ ). Na análise de risco para o desenvolvimento do Lúpus, verificou-se pelo modelo dominante que portadores do alelo G apresentam proteção no desenvolvimento do Lúpus (Tabela 4). Indivíduos portadores do genótipo TT têm aproximadamente três vezes e meia mais chance de desenvolverem Lúpus ( $OR=3,61$ ;  $p=0,0011$ ).

Na análise do SNP 3'UTR +1188 (A/C) (rs3212227) do gene *IL12B* foi observado que as frequências genóticas estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Houve diferença significativa na distribuição dos genótipos entre o grupo de pacientes com LES e o grupo controle sendo o genótipo AA mais frequente no grupo controle e o genótipo CC no grupo de pacientes ( $p<0,0001$ ). O alelo C apresentou-se como fator de risco para o desenvolvimento da doença tanto na análise pelo modelo dominante ( $OR=3,3153$ ;  $p=0,0012$ ) quanto na comparação entre os genótipos portadores do alelo (Tabela 4).

As distribuições genóticas do polimorfismo 2199 (A/C) do gene *IL23R* apresentou-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo controle, o que não foi observado para o grupo de pacientes.

Foi analisado o perfil alélico e genotípico do polimorfismo como com o desenvolvimento do Lúpus. A distribuição apresentou-se significativamente diferente entre pacientes e controles, o genótipo AC apresentou-se mais frequente entre os pacientes enquanto que o genótipo AA foi mais frequente entre os controles ( $p<0,0001$ ). Foi observado que o genótipo AC confere aproximadamente oito vezes mais risco ( $OR=8,6364$ ;  $p<0,0001$ ) e que indivíduos portadores do alelo C possuem aproximadamente sete vezes mais risco no desenvolvimento da doença ( $OR=7,25$ ;  $p<0,0001$ ) Tabela 4.

**Tabela 4:** Distribuição genotípica e associação dos polimorfismos -308(G/A) do TNF $\alpha$  IL2 -330 (T/G), IL12 3'UTR +1188 (A/C), IL17A -197(G/A), IL17F +7488 (A/G) e IL23R +2199 (A/C) em pacientes com LES e controles

| Genótipo                      | Pacientes LES   | Controles       | $\chi^2$ (p value)                    | OR (95% CI)            | p                 |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|---------------------------------------|------------------------|-------------------|
| <b>TNF<math>\alpha</math></b> | <b>n=98(%)</b>  | <b>n=76(%)</b>  |                                       |                        |                   |
| GG                            | 58 (59,18)      | 61 (80,26)      | 13,439 ( <b>0,0012</b> )              | Referência             |                   |
| GA                            | 28 (28,57)      | 15 (19,74)      |                                       | 1,9632 (0,9529-4,0448) | 0,0957            |
| AA                            | 12 (12,24)      | 0 (0)           |                                       | -                      | -                 |
| GA + AA                       | 40 (40,81)      | 15 (19,74)      |                                       | 3,3889 (1,6767-6,8495) | <b>0,0009</b>     |
| <b>IL17A</b>                  | <b>n=118(%)</b> | <b>n=120(%)</b> |                                       |                        |                   |
| GG                            | 46 (38,98)      | 60(50,00)       | 11,617( <b>0,0030</b> )               | Referência             | -                 |
| GA                            | 65 (55,08)      | 42(35,00)       |                                       | 2,0186(1,1693-3,4848)  | <b>0,0165</b>     |
| AA                            | 7 (5,93)        | 18(15,00)       |                                       | 0,5072(0,1954-1,3166)  | 0,2363            |
| GA + AA                       | 72 (61,01)      | 60 (50,00)      |                                       | 1,5652(0,9355-2,6188)  | 0,1425            |
| <b>IL17F</b>                  | <b>n=118(%)</b> | <b>n=120(%)</b> |                                       |                        |                   |
| AA                            | 79 (66,95)      | 101(84,17)      | 15,291( <b>0,0005</b> )               | Referência             | -                 |
| AG                            | 39 (33,05)      | 16(13,33)       |                                       | 3,1163(1,6234-5,9821)  | <b>0,0008</b>     |
| GG                            | 0 (0)           | 3(2,5)          |                                       | -                      | -                 |
| AG+GG                         | 39              | 19 (            |                                       | 2,6243(1,4083-4,8899)  | <b>0,0033</b>     |
| <b>IL2</b>                    | <b>n=98(%)</b>  | <b>n=76(%)</b>  |                                       |                        |                   |
| TG                            | 13 (13,98)      | 27 (36,99)      | 10,61( <b>p=0,0011</b> ) <sup>†</sup> | Referência             | -                 |
| TT                            | 80 (86,02)      | 46 (63,01)      |                                       | 3,612(1,6985-7,6814)   | <b>0,0011</b>     |
| <b>IL12B</b>                  | <b>n=93(%)</b>  | <b>n=75(%)</b>  |                                       |                        |                   |
| AA                            | 16 (17,2)       | 31(41,33)       | 19,823( <b>&lt;0,0001</b> )           | Referência             | -                 |
| AC                            | 43 (46,2)       | 37(49,33)       |                                       | 2,2517(1,0674-4,7499)  | <b>0,0493</b>     |
| CC                            | 34(36,56)       | 8(9,34)         |                                       | 8,2344(3,0955-21,9044) | <b>&lt;0,0001</b> |
| AC+CC                         | 77(82,76)       | 45(58,67)       |                                       | 3,3153(1,6355-6,7204)  | <b>0,0012</b>     |
| <b>IL23R</b>                  | <b>n=95(%)</b>  | <b>n=125(%)</b> |                                       |                        |                   |
| AA                            | 8 (8,42)        | 50 (40,0)       | 32,914( <b>&lt;0,0001</b> )           | Referência             | -                 |
| AC                            | 76 (80,0)       | 55 (44,0)       |                                       | 8,6364(3,7921-19,6689) | <b>&lt;0,0001</b> |
| CC                            | 11 (11,58)      | 20 (36,0)       |                                       | 3,4375(1,2053-9,8038)  | <b>0,0351</b>     |
| AC+CC                         | 87 (91,58)      | 75 (80,0)       |                                       | 7,2500(3,2326-16,2602) | <b>&lt;0,0001</b> |

<sup>†</sup>= $\chi^2$  com correção de Yates; p= Odds Ratio

### 5.3 Associação dos polimorfismos TNF $\alpha$ -308 (G/A), IL2 -330 (T/G), IL12 3'UTR +1188 (A/C), IL17A -197(G/A), IL17F +7488 (A/G) e IL23R +2199 (A/C) com a atividade do LES

Os testes de associação mostraram que os polimorfismos estudados não associados com a atividade do LES (Tabela 5).

**Tabela 5:** Distribuição genotípica dos polimorfismos  $TNF\alpha$  -308 (G/A), IL2 -330 (T/G), IL12 3'UTR +1188 (A/C), IL17A -197(G/A), IL17F +7488 (A/G) e IL23R +2199 (A/C) e associação com nível de atividade do LES

| Genotipo              | Inativo    | Leve + Moderado | Severo     | p      |
|-----------------------|------------|-----------------|------------|--------|
| <b>TNFα</b> n=98(%)   |            |                 |            |        |
| GG                    | 21 (36,20) | 14 (24,13)      | 23 (39,65) | 0,7050 |
| GA                    | 13 (46,42) | 7 (25,00)       | 08 (28,57) |        |
| AA                    | 3 (25,00)  | 4 (33,34)       | 05 (41,67) |        |
| <b>IL17A</b> n=118(%) |            |                 |            |        |
| GG                    | 19(41,30)  | 15(32,61)       | 12(26,09)  | 0,6167 |
| GA                    | 26(40,00)  | 17(26,15)       | 22(33,85)  |        |
| AA                    | 2(28,57)   | 1(14,29)        | 4(57,14)   |        |
| <b>IL17F</b> n=118(%) |            |                 |            |        |
| AA                    | 32 (40,51) | 25 (31,65)      | 22 (27,85) | 0,3303 |
| AG                    | 14 (35,90) | 9 (23,08)       | 16 (41,03) |        |
| <b>IL2</b> n=93(%)    |            |                 |            |        |
| TT                    | 31(38,75)  | 23(28,75)       | 26(32,5)   | 0,0838 |
| TG                    | 4(30,78)   | 1(7,68)         | 8(61,54)   |        |
| <b>IL12B</b> n=93(%)  |            |                 |            |        |
| AA                    | 7(43,75)   | 4(25,0)         | 5(31,25)   | 0,5136 |
| AC                    | 18(43,90)  | 8(14,64)        | 17(41,46)  |        |
| CC                    | 10 (29,42) | 12 (35,29)      | 12 (35,29) |        |
| <b>IL23R</b> n=95(%)  |            |                 |            |        |
| AA                    | 3 (37,5)   | 2 (25,0)        | 3 (37,5)   | 0,7053 |
| AC                    | 29 (38,16) | 20 (26,31)      | 27 (35,53) |        |
| CC                    | 4 (36,36)  | 5 (45,45)       | 2 (18,19)  |        |

p= Teste do  $\chi^2$

#### 5.4 Associação dos polimorfismos $TNF\alpha$ -308 (G/A), IL2 -330 (T/G), IL12 3'UTR +1188 (A/C), IL17A -197(G/A), IL17F +7488 (A/G) e IL23R +2199 (A/C) com as características clínicas do LES.

Para o polimorfismo -308 (G/A) do gene  $TNF\alpha$  o alelo G conferiu proteção (Tabela 6) enquanto que o alelo A apresentou uma chance de risco três vezes maior para o desenvolvimento de Serosite, (OR=3,3277; p=0,0228).

**Tabela 6:** Associação entre o polimorfismo -308 (G/A) do gene *TNF $\alpha$*  e as características clínicas do Lúpus

| Características clínicas |   | N=98 | Pacientes <i>TNF<math>\alpha</math></i> |       | $\chi^2 p$           | OR (95% CI)           | <i>p</i> **   |
|--------------------------|---|------|-----------------------------------------|-------|----------------------|-----------------------|---------------|
|                          |   |      | GG                                      | GA+AA |                      |                       |               |
| Rash malar               | p | 68   | 40                                      | 28    | 0,012 (0,913)        | 0,95 (0,396-2,286)    | ns            |
|                          | a | 30   | 18                                      | 12    |                      |                       |               |
| Rash Discóide            | p | 37   | 26                                      | 11    | 3,025 (0,082)        | 0,47 (0,196-1,109)    | ns            |
|                          | a | 61   | 32                                      | 29    |                      |                       |               |
| Fotosensibilidade        | p | 74   | 44                                      | 30    | 0,010 (0,922)        | 1,27 (0,492-3,291)    | ns            |
|                          | a | 24   | 14                                      | 10    |                      |                       |               |
| Úlcera Oral              | p | 40   | 26                                      | 4     | 0,946 (0,330)        | 0,66 (0,288-1,520)    | ns            |
|                          | a | 58   | 26                                      | 26    |                      |                       |               |
| Artrite                  | p | 88   | 53                                      | 25    | 0,389 (0,532)        | 0,66 (0,178-2,450)    | ns            |
|                          | a | 10   | 5                                       | 5     |                      |                       |               |
| Desordens Renais         | p | 47   | 28                                      | 19    | 0,059 (0,807)        | 0,90 (0,404-2,026)    | ns            |
|                          | a | 51   | 30                                      | 21    |                      |                       |               |
| Desordens Neurológicas   | p | 26   | 18                                      | 8     | 1,479 (0,224)        | 0,56 (0,214-1,442)    | ns            |
|                          | a | 72   | 40                                      | 32    |                      |                       |               |
| Serosite                 | p | 31   | 24                                      | 7     | <b>6,242 (0,012)</b> | 3.327(1.2632- 8.7665) | <b>0,0228</b> |
|                          | a | 67   | 34                                      | 33    |                      |                       |               |
| Desordens Hematológicas  | p | 59   | 32                                      | 27    | 1,502 (0,220)        | 1,69 (0,728-3,908)    | ns            |
|                          | a | 39   | 26                                      | 13    |                      |                       |               |
| Desordens Imunológicas   | p | 32   | 19                                      | 13    | 0,001 (0,978)        | 0,99 (0,418-2,334)    | ns            |
|                          | a | 66   | 39                                      | 27    |                      |                       |               |
| FAN                      | p | 86   | 51                                      | 35    | 0,004 (0,949)        | 0,96 (0,282-3,272)    | ns            |
|                          | a | 12   | 7                                       | 5     |                      |                       |               |

p=presença da característica; a=ausência da característica; p\*=Teste do  $\chi^2$ ; p\*\*=Odds Ratio

Diferentemente do que foi encontrado para o gene *TNF $\alpha$* , não foi observada associação entre o polimorfismo -197(G/A) do gene *IL17A* com o desenvolvimento das características clínicas (Tabela 7).

**Tabela 7:** Associação entre o polimorfismo -197(G/A) do gene IL17A e as características clínicas do Lúpus

| Características clínicas |   | N=118 | Pacientes <i>IL17A</i> |       | <i>p</i>             | OR (95% CI)           | <i>p</i> ** |
|--------------------------|---|-------|------------------------|-------|----------------------|-----------------------|-------------|
|                          |   |       | GG                     | GA+AA |                      |                       |             |
| Rash malar               | p | 115   | 45                     | 70    | 0,8500 <sup>†</sup>  | 0,7778(0,0685-8,8306) | 0,6919      |
|                          | a | 3     | 1                      | 2     |                      |                       |             |
| Rash Discóide            | p | 48    | 21                     | 27    | 0,3793 <sup>††</sup> | 0,7143(0,3370-1,514)  | 0,4920      |
|                          | a | 70    | 25                     | 45    |                      |                       |             |
| Fotosensibilidade        | p | 94    | 33                     | 61    | 0,0875 <sup>††</sup> | 2,1846(0,8813-5,4154) | 0,1404      |
|                          | a | 24    | 13                     | 11    |                      |                       |             |
| Úlcera Oral              | p | 49    | 14                     | 35    | 0,0507 <sup>††</sup> | 2,1622(0,9914-4,7156) | 0,0780      |
|                          | a | 69    | 32                     | 37    |                      |                       |             |
| Artrite                  | p | 105   | 42                     | 63    | 0,5198 <sup>††</sup> | 0,6667(0,1928-2,3057) | 0,7321      |
|                          | a | 13    | 4                      | 9     |                      |                       |             |
| Desordens Renais         | p | 55    | 21                     | 34    | 0,8676 <sup>††</sup> | 1,0652(0,5071-2,2372) | 0,9821      |
|                          | a | 63    | 25                     | 38    |                      |                       |             |
| Desordens Neurológicas   | p | 27    | 11                     | 16    | 0,8311 <sup>††</sup> | 0,9091(0,3785-2,1834) | 0,9909      |
|                          | a | 91    | 35                     | 56    |                      |                       |             |
| Serosite                 | p | 36    | 11                     | 25    | 0,2136 <sup>††</sup> | 0,8462(0,4115-1,7402) | 0,7873      |
|                          | a | 82    | 35                     | 47    |                      |                       |             |
| Desordens Hematológicas  | p | 51    | 24                     | 27    | 0,1166 <sup>††</sup> | 0,5500(0,2598-1,1642) | 0,1680      |
|                          | a | 67    | 22                     | 45    |                      |                       |             |
| Desordens Imunológicas   | p | 39    | 17                     | 22    | 0,4710 <sup>††</sup> | 0,7506(0,3437-1,6390) | 0,6029      |
|                          | a | 79    | 29                     | 50    |                      |                       |             |
| FAN                      | p | 106   | 42                     | 64    | 0,6760 <sup>†</sup>  | 0,7619(0,2157-2,6908) | 0,9115      |
|                          | a | 12    | 4                      | 8     |                      |                       |             |

p=presença da característica; a=ausência da característica; †=Teste G Williams; ††=Teste  $\chi^2$ ; *p*\*\*=Odds Ratio

Para o gene *IL17F* também não foi encontrada associação entre o polimorfismo e o desenvolvimento das características clínicas (Tabela 8).

**Tabela 8:** Associação entre o polimorfismo 7488(A/G) do gene *IL17F* e as características clínicas do Lúpus

| Características clínicas |        | N=118     | Pacientes IL17F |          | <i>p</i>             | OR (95% CI)            | <i>p</i> ** |
|--------------------------|--------|-----------|-----------------|----------|----------------------|------------------------|-------------|
|                          |        |           | AA              | AG       |                      |                        |             |
| Rash malar               | p<br>a | 115<br>3  | 77<br>2         | 38<br>1  | 0,9923 <sup>†</sup>  | 0,9870(0,0867-11,2309) | 0,5411      |
| Rash Discóide            | p<br>a | 50<br>68  | 32<br>47        | 18<br>21 | 0,5592 <sup>††</sup> | 1,2589(0,5809-2,7282)  | 0,6995      |
| Fotosensibilidade        | p<br>a | 94<br>24  | 60<br>19        | 34<br>5  | 0,1540 <sup>††</sup> | 2,1533(0,7377-6,2855)  | 0,2370      |
| Úlcera Oral              | p<br>a | 49<br>69  | 28<br>51        | 21<br>18 | 0,0563 <sup>††</sup> | 2,1250(0,9738-4,6371)  | 0,0873      |
| Artrite                  | p<br>a | 104<br>14 | 71<br>8         | 33<br>6  | 0,4143 <sup>†</sup>  | 0,6197(0,1989-1,9304)  | 0,5973      |
| Desordens Renais         | p<br>a | 54<br>64  | 37<br>42        | 17<br>22 | 0,7392 <sup>††</sup> | 0,8771(0,4053-1,8981)  | 0,8914      |
| Desordens Neurológicas   | p<br>a | 25<br>93  | 18<br>61        | 7<br>32  | 0,5454 <sup>††</sup> | 0,7413(0,2804-1,9599)  | 0,7149      |
| Serosite                 | p<br>a | 34<br>84  | 23<br>56        | 11<br>28 | 0,9183 <sup>††</sup> | 0,9565(0,4089-2,2373)  | 0,9096      |
| Desordens Hematológicas  | p<br>a | 52<br>66  | 32<br>47        | 20<br>19 | 0,2674 <sup>††</sup> | 1,5461(0,7144-3,3460)  | 0,3618      |
| Desordens Imunológicas   | p<br>a | 40<br>78  | 23<br>56        | 17<br>22 | 0,1181 <sup>††</sup> | 1,8814(0,8474-4,1773)  | 0,1751      |
| FAN                      | p<br>a | 107<br>11 | 71<br>8         | 36<br>3  | 0,6723 <sup>†</sup>  | 1,3521(0,3381-5,4079)  | 0,9273      |

p=presença da característica; a=ausência da característica; †=Teste G Williams; ††=Teste  $\chi^2$ ; *p*\*\*=Odds Ratio

Quando analisada a influência do polimorfismo -330 (T/G) do gene *IL2* com o desenvolvimento das características clínicas, observa-se que o genótipo TG está associado com o desenvolvimento de FAN ( $p < 0,0001$ ) e confere um risco de aproximadamente 58 vezes no desenvolvimento da característica (OR=58,333;

$p < 0,0001$ ). Além do FAN, o polimorfismo mostra uma tendência para o risco de desenvolvimento de serosite (Tabela 9).

**Tabela 9:** Associação entre o polimorfismo -330 (T/G) do gene *IL2* e as características clínicas do Lúpus

| Características clínicas |   | N=93 | Pacientes IL2 |    | p                 | OR (95% CI)            | p*                |
|--------------------------|---|------|---------------|----|-------------------|------------------------|-------------------|
|                          |   |      | TT            | TG |                   |                        |                   |
| Rash malar               | p | 61   | 53            | 8  | 0,7419            | 0,8151(0,2431-2,7325)  | 0,9865            |
|                          | a | 32   | 27            | 5  |                   |                        |                   |
| Rash Discóide            | p | 36   | 33            | 3  | 0,1981            | 0,4273(0,1091-1,6728)  | 0,3469            |
|                          | a | 57   | 47            | 10 |                   |                        |                   |
| Fotosensibilidade        | p | 70   | 62            | 8  | 0,2347            | 0,4645(0,1352-1,5963)  | 0,3731            |
|                          | a | 23   | 18            | 5  |                   |                        |                   |
| Úlcera Oral              | p | 35   | 30            | 5  | 0,9471            | 1,0417(0,3120-3,4778)  | 0,8086            |
|                          | a | 58   | 50            | 8  |                   |                        |                   |
| Artrite                  | p | 84   | 72            | 12 | 0,7884            | 1,3333(0,1527-11,6411) | 0,8067            |
|                          | a | 9    | 8             | 1  |                   |                        |                   |
| Desordens Renais         | p | 41   | 37            | 4  | 0,2900            | 0,5165(0,1469-1,8157)  | 0,4584            |
|                          | a | 52   | 43            | 9  |                   |                        |                   |
| Desordens Neurológicas   | p | 23   | 20            | 3  | 0,8807            | 0,900(0,2251-3,5987)   | 0,8434            |
|                          | a | 70   | 60            | 10 |                   |                        |                   |
| Serosite                 | p | 26   | 19            | 7  | <b>0,0327</b>     | 3,7456(1,1215-12,5097) | <b>0,0562</b>     |
|                          | a | 67   | 61            | 6  |                   |                        |                   |
| Desordens Hematológicas  | p | 42   | 37            | 5  | 0,5989            | 0,7264(0,2186-2,4133)  | 0,8236            |
|                          | a | 51   | 43            | 8  |                   |                        |                   |
| Desordens Imunológicas   | p | 30   | 27            | 3  | 0,4336            | 0,5889(0,1495-2,3196)  | 0,6573            |
|                          | a | 63   | 53            | 10 |                   |                        |                   |
| FAN                      | p | 71   | 70            | 1  | <b>&lt;0,0001</b> | 58,333(6,8294-498,256) | <b>&lt;0,0001</b> |
|                          | a | 22   | 10            | 12 |                   |                        |                   |

p= presença da característica; a= ausência da característica; P= Teste G; p\*=Odds Ratio

Na população estudada, o polimorfismo 3'UTR +1188 (A/C) do gene *IL12* não está associado com o desenvolvimento de nenhuma característica clínica (Tabela 10).

**Tabela 10:** Associação entre o polimorfismo 3'UTR +1188 (A/C) do gene *IL12* e características clínicas do Lúpus

| Características clínicas |   | N=93 | Pacientes IL12 |       | p      | OR (95% CI)           | p*     |
|--------------------------|---|------|----------------|-------|--------|-----------------------|--------|
|                          |   |      | AA             | AC+CC |        |                       |        |
| Rash malar               | p | 61   | 10             | 51    | 0,7760 | 1,1769(0.3852-3.5960) | 0,9975 |
|                          | a | 32   | 6              | 26    |        |                       |        |
| Rash Discoide            | p | 36   | 6              | 30    | 0,9129 | 1,0638(0.3503-3.2311) | 0,8628 |
|                          | a | 57   | 10             | 47    |        |                       |        |
| Fotosensibilidade        | p | 70   | 12             | 58    | 0,9782 | 1,0175(0.2931-3.5323) | 0,7710 |
|                          | a | 23   | 4              | 19    |        |                       |        |
| Úlcera Oral              | p | 36   | 6              | 30    | 0,9129 | 1,0638(0.3503-3.2311) | 0,8628 |
|                          | a | 57   | 10             | 47    |        |                       |        |
| Artrite                  | p | 81   | 13             | 68    | 0,4626 | 1,7436(0.4152-7.3229) | 0,7212 |
|                          | a | 12   | 3              | 9     |        |                       |        |
| Desordens Renais         | p | 39   | 7              | 32    | 0,8718 | 0,9143(0.3084-2.7106) | 0,9071 |
|                          | a | 54   | 9              | 45    |        |                       |        |
| Desordens Neurológicas   | p | 22   | 3              | 19    | 0,6042 | 1,4195(0.3650-5.5204) | 0,8538 |
|                          | a | 71   | 13             | 58    |        |                       |        |
| Serosite                 | p | 26   | 6              | 20    | 0,3609 | 0,5848(0.1883-1.8159) | 1,8159 |
|                          | a | 67   | 10             | 57    |        |                       |        |
| Desordens Hematológicas  | p | 53   | 10             | 43    | 0,6229 | 0,7588(0.2507-2.2970) | 0,8322 |
|                          | a | 40   | 6              | 34    |        |                       |        |
| Desordens Imunológicas   | p | 29   | 7              | 22    | 0,2436 | 0,5143(0.1704-1.5521) | 0,3702 |
|                          | a | 64   | 9              | 55    |        |                       |        |
| FAN                      | p | 82   | 15             | 67    | 0,4162 | 0,4467(0.0531-3.7607) | 0,7384 |
|                          | a | 11   | 1              | 10    |        |                       |        |

p= presença da característica; a= ausência da característica; p=Teste G; p\*=Odds Ratio

Para o gene *IL23R* observou-se que, na população estudada, o polimorfismo 2199 (A/C) não está associado com o desenvolvimento de características clínicas (Tabela 11).

**Tabela 11** - Associação entre o polimorfismo 2199 (A/C) do gene *IL23R* e características clínicas do Lúpus

| Características clínicas |        | N=95     | Pacientes <i>IL23R</i> |          | <i>p</i> | OR (95% CI)            | <i>p</i> * |
|--------------------------|--------|----------|------------------------|----------|----------|------------------------|------------|
|                          |        |          | AA                     | AC+CC    |          |                        |            |
| Rash malar               | p<br>a | 93<br>2  | 8<br>0                 | 85<br>2  | 0,5508   | -                      | -          |
| Rash Discoide            | p<br>a | 36<br>59 | 4<br>4                 | 32<br>55 | 0,4669   | 0,5818(0,1361-2,4874)  | 0,7213     |
| Fotosensibilidade        | p<br>a | 73<br>22 | 6<br>2                 | 67<br>20 | 0,8981   | 1,1167(0,2089-5,9703)  | 0,7574     |
| Úlcera Oral              | p<br>a | 37<br>58 | 1<br>7                 | 36<br>51 | 0,0843   | 4,9412(0,5823-41,9270) | 0,2209     |
| Artrite                  | p<br>a | 86<br>9  | 8<br>0                 | 78<br>9  | 0,1966   | -                      | -          |
| Desordens Renais         | p<br>a | 43<br>52 | 6<br>2                 | 37<br>50 | 0,0741   | 0,2467(0,0471-1,2919)  | 0,1631     |
| Desordens Neurológicas   | p<br>a | 21<br>74 | 3<br>5                 | 18<br>69 | 0,3005   | 0,4348(0,0949-1,9929)  | 0,5148     |
| Serosite                 | p<br>a | 26<br>69 | 1<br>7                 | 25<br>62 | 0,2897   | 2,8226(0,3300-24,1387) | 0,5678     |
| Desordens Hematológicas  | p<br>a | 43<br>52 | 3<br>5                 | 40<br>47 | 0,6427   | 1,4184(0,3190-6,3075)  | 0,9284     |
| Desordens Imunológicas   | p<br>a | 31<br>64 | 2<br>6                 | 29<br>58 | 0,6231   | 1,5000(0,2849-7,8989)  | 0,9306     |
| FAN                      | p<br>a | 85<br>10 | 7<br>1                 | 78<br>9  | 0,8527   | 1,2381(0,1364-11,2412) | 0,6805     |

p=presença da característica; a=ausência da característica; p=Teste G; p\*=Odds Ratio.

## 6. Discussão

O lúpus eritematoso sistêmico é uma doença autoimune grave caracterizada por inflamação crônica, a produção de autoanticorpos e danos a múltiplos órgãos (Jimenez et al., 2003). Com um número crescente de citocinas e quimiocinas identificadas e com a melhora da compreensão dos seus papéis biológicos, estas moléculas passaram a ser colocadas como peças chaves na patogênese do LES ou como marcadores indiretos refletindo respostas imunes desreguladas no LES (Adhya et al., 2011; Apostolidis et al., 2011; Davis et al., 2011). O presente trabalho avaliou o papel de polimorfismos em genes de citocinas pro-inflamatórias na suscetibilidade, atividade e aspectos clínicos do Lúpus Eritematoso Sistêmico.

No presente trabalho o polimorfismo -308(G/A) (rs1800629) do gene *TNF $\alpha$*  mostrou-se estar associado com a susceptibilidade ao LES, no qual indivíduos portadores do alelo A tem um risco três vezes maior para o desenvolvimento da patologia (OR = 3,3889; p=0,0009). Nossos dados corroboram com outros estudos realizados em diferentes populações como colombianos (Guarnizo-Zuccardi et al., 2007), mexicanos (Jiménez-Morales et al., 2009), asiáticos (Ma et al., 2010) e caucasianos (Parks et al., 2004), nos quais encontraram associação entre o polimorfismo e o desenvolvimento do LES.

Contudo, outros estudos analisaram o polimorfismo -308 (G/A) e LES em diferentes populações tendo sido encontrado resultados contraditórios. Em mexicanos (Zúñiga et al., 2001), afro-americanos (Parks et al., 2004), tailandeses (Hirankarn et al., 2007) e portugueses (Santos et al., 2011) os estudos não mostraram associação entre o polimorfismo TNF -308 e LES. Assim, é importante

especular que os resultados contraditórios possam ser atribuídos às diferentes distribuições alélicas dos grupos étnicos avaliados, associado a possíveis influências ambientais distintas.

Vários SNPs (-238, -308, -857, -863 e -1031) localizados no interior da região promotora do gene do TNF têm sido estudados e alguns deles estão associados com alterações nos níveis de TNF, podendo influenciar na susceptibilidade e gravidade de doenças, sendo polimorfismos úteis e funcionais para estudos de associação com doença (Lee et al., 2006; Azizah et al., 2004; Zúñiga et al., 2001; Parks et al., 2004; . Tobón et al., 2005; Hirankarn et al., 2007; Asghar et al., 2004). No entanto, o SNP -308 (G/A) é o melhor descrito por estar em uma posição que modifica a sequência consenso para o sítio de ligação do fator de transcrição AP-2 o que pode acarretar em aumento da expressão do  $TNF\alpha$  (Rhoades et al., 1992) e como consequência, acentuar a reação inflamatória característica da doença.

No presente trabalho foi observada associação entre o desenvolvimento de Serosite com a presença do polimorfismo -308(G/A) do  $TNF\alpha$ . A Serosite é uma inflamação dos tecidos serosos do corpo, os tecidos que revestem os pulmões (pleura), coração (pericárdio), do revestimento interno do abdômen (peritônio) e órgãos internos, sendo um achado comum entre a vasta gama de manifestações de pacientes com LES. O prognóstico de serosite em lúpus é geralmente bom, mas em alguns casos, pode ser fatal (Man & Mok, 2005; Zhou et al., 2009).

Este é o primeiro trabalho a apresentar associação entre o polimorfismo -308 (G/A) e a Serosite. Outros estudos que avaliaram o polimorfismo -308 (G/A) do gene  $TNF\alpha$  em pacientes com LES e desenvolvimento de manifestações

clínicas do LES e não encontrando associação (Parks et al., 2004; Suárez et al., 2005; Tobón et al., 2005; Hirankarn et al., 2007).

Além disso, nossos resultados sugerem que o polimorfismo -308 (G/A) do gene *TNF $\alpha$*  está associado à suscetibilidade ao LES. Desta forma, podemos concluir que este SNP apresenta um importante papel na suscetibilidade e na patogênese do LES, provavelmente por acentuar a resposta inflamatória em indivíduos portadores do alelo associado à maior produção da citocina.

Não existem dados na literatura que avaliem a associação entre o polimorfismo na região -330 (T/G) do gene da *IL2* e LES. Quando analisada a distribuição genotípica do polimorfismo entre pacientes e controles, observou-se, no presente estudo, que o genótipo TT conferiu três vezes mais risco no desenvolvimento do LES (OR=3,612; p=0,0011). Estudos mostram que indivíduos com LES apresentam baixos níveis de IL2 (Solomou et al., 2001; Crispín & Tsokos, 2008) e que o genótipo TT é descrito com um baixo produtor de IL2 (John et al., 1998).

A IL2 é essencial tanto para a indução quanto para a supressão da resposta imune. Células T de pacientes LES positivo produzem IL2 em menor quantidade, fato este que contribui para a susceptibilidade a infecções e aumento no tempo de vida de linfócitos autorreativos (Nelson, 2004). Assim, nossos resultados corroboram com a ideia de que o genótipo de baixa produção de IL2 é um fator de risco no desenvolvimento do LES.

Nossos resultados estão em concordância com outros estudos que também encontraram associação ao avaliar polimorfismo -330 (T/G) do gene *IL2* com o desenvolvimento de doenças autoimunes. Shahbazi e colaboradores (2010) mostraram um significativo aumento na frequência do alelo T e dos

genótipos TT/ e T/G em pacientes com esclerose múltipla em relação ao grupo controle.

Nossos dados apontam um efeito protetor do alelo G no desenvolvimento do Lúpus. Cavanillas et al. (2010) encontraram uma maior frequência do alelo G na população controle saudável comparada a população com esclerose múltipla, e Pyo et al. (2003) também encontraram uma maior frequência do alelo G na população coreana de indivíduos saudáveis sem histórico de doenças autoimunes.

Por outro lado, resultados contraditórios mostram a associação do alelo G com o desenvolvimento de doenças autoimunes. Um estudo realizado na Coreia mostrou que o alelo G do polimorfismo -330(T/G) do gene *IL2* está associado com o desenvolvimento de Psoríase (Kim et al., 2007), e um estudo realizado em uma população turca aponta que o genótipo TT é demonstrado como fator de proteção para o desenvolvimento da doença de Beçeht (Yücel et al., 2013). Esta oposição de resultados pode ser devido à diferenças étnicas das populações estudadas, assim como, a *IL2* pode influenciar de forma distinta o aparecimento e progressão de diferentes doenças autoimunes sendo um fator indutor para algumas e protetor para outras.

Além disso, estudos mostram a não associação do SNP rs2069762 com o desenvolvimento de doenças autoimunes. Um estudo realizado em uma população espanhola analisou que esse SNP não está associado com o desenvolvimento de Esclerose Múltipla (Fedetz et al., 2009), enquanto que um outro realizado em uma população polonesa, mostrou ausência de associação com o desenvolvimento de diabetes Tipo 1 (Fichna et al., 2013).

Na avaliação da associação entre a presença do polimorfismo com os aspectos clínicos dos pacientes com LES, foi observado que o genótipo TG foi associado com a positividade para o FAN (OR=3,612; p=0,0011). Apesar da frequência do genótipo TG ser mais significativa em pacientes com serosite, esta apresentou apenas uma tendência no desenvolvimento da característica (OR=3,7456; p=0,0562).

O genótipo TG é caracterizado por maior produção de IL2 em relação ao genótipo TT (John et al., 1998). A IL2 ativa células T CD8+ citotóxicas (Kim et al., 2006), assim uma maior produção de IL2 acarretaria em uma maior ativação dessas células, o que pode consequenciar em um aumento da exposição de dsDNA às células efetoras (Ardoin & Pisetsky, 2008), e consequentemente, aumento dos níveis de FAN.

Um estudo realizado por Lin e colaboradores (2008) em uma população de Taiwan, avaliou a associação entre o SNP rs2069763, também localizado no gene *IL2* e o Lúpus Eritematoso, no qual foi observada associação entre este polimorfismo e duas características clínicas, Rash Discóide e Fator Antinuclear. Até o momento este o único trabalho a avaliar o papel de polimorfismo da interleucina 2 com o desenvolvimento das características clínicas do Lúpus.

Por outro lado, há estudos que mostram a falta de associação entre o SNP -330(T/G) com o desenvolvimento de doenças autoimunes. Em um estudo realizado em uma população espanhola com indivíduos com esclerose múltipla, foi observado que este polimorfismo não é fator de risco para o desenvolvimento da doença (Fedtz et al., 2009). Queiroz e colaboradores (2009) também não encontraram associação com o polimorfismo e o desenvolvimento de doença de Crohn em uma população brasileira. Desta forma, pode-se deduzir que a

susceptibilidade do polimorfismo -330(G/T) do gene IL2 pode variar de acordo com o tipo da doença, provavelmente devido às diferentes vias de sinalização e tipos celulares envolvidos nas patologias.

A IL12B é uma citocina próinflamatória que ativa a diferenciação de células naíve em células Th1 (Trinchieri & Sher, 2007), o que traz como consequência a produção de IL2 pelas células T ativadas (Lowental et al., 1985).

No presente estudo, observou-se que o genótipo CC (OR=8,2344;  $p<0,0001$ ) e o alelo C (OR= 3,3153;  $p=0,0012$ ) do polimorfismo 3' UTR +1188 (A/C) do gene *IL12B* (rs3212227) conferiram risco no desenvolvimento do Lúpus. Os dados de nosso estudo corroboram com os resultados de Metiva et al., (2012) que encontrou associação entre o polimorfismo rs3212227 e o desenvolvimento do LES em uma população da Bulgária.

Pelo fato deste polimorfismo estar associado ao aumento da produção de IL12B (Seegers et al., 2002), e esta interleucina ser um potente indutor da resposta inflamatória por acentuar a resposta Th1, é possível que com a presença do alelo C ocorra o aumento do processo inflamatório associado ao reconhecimento de auto antígenos (característicos do LES).

Outros estudos mostram associação entre o polimorfismo 3'UTR +1188 (A/C) do gene *IL12B* com o desenvolvimento de outras doenças autoimunes. O alelo C confere risco no desenvolvimento de espondilite anquilosante (Wong et al., 2012). Oka e colaboradores (2013), estudando pacientes japoneses com psoríase, encontraram associação entre o SNPs rs3212227 do gene *IL12B* e o desenvolvimento da doença. Além disso, Tsunemi e colaboradores (2002), também em uma população japonesa, encontraram associação entre o SNP e o desenvolvimento de dermatite atópica. Chen e colaboradores (2011) observaram

associação entre o polimorfismo e o desenvolvimento de asma na avaliação de pacientes chineses.

Contudo, Sánchez et al. (2005) não encontrou associação entre o polimorfismo 3'UTR +1188 (A/C) do gene *IL12B* e o desenvolvimento do LES em uma população espanhola. Similarmente, estudos mostram ausência de associação deste polimorfismo com outras doenças autoimunes, tais como, doença celíaca (Seegers et al., 2003), doença inflamatória do intestino (Glas et al., 2012), esclerose múltipla (Liu et al., 2014), Psoríase (Boca et al., 2013) e diabetes tipo I (Johansson et al., 2001; Nistico et al., 2002).

Em relação à atividade e características clínicas da doença, não foi observada diferença significativa na distribuição dos genótipos entre os subgrupos de atividade, bem como dos aspectos clínicos. Os resultados sugerem que o polimorfismo por si só não tem a capacidade de influenciar na evolução da doença.

No presente trabalho foram analisados dois polimorfismos dos dois principais genes da família IL17, os SNPs -197(G/A) do gene *IL17A* (rs2275913) e 7488 (A/G) do gene *IL17F* (rs763780). Não há estudos anteriores que examinam o papel destes polimorfismos com o desenvolvimento de lúpus e suas características clínicas, sendo este o primeiro a tentar descrever esta associação, contudo, existem estudos que associam ambas as citocinas com o desenvolvimento de várias doenças autoimunes, incluindo a esclerose múltipla, a artrite reumatóide e lúpus eritematoso, em que os pacientes expressam quantidades elevadas de IL17 (Frisullo et al, 2008; Ziolkowska et al, 2000; Doreau et al. , 2009; Mok et al 2010)

No presente estudo, a distribuição genotípica dos grupos de pacientes e controles para os SNPs rs2275913 e rs763780 não se apresentaram de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Isto pode ser devido à composição genética da população estudada, já que as distribuições dos genótipos entre os vários grupos étnicos do mundo varia substancialmente. O Brasil tem uma população altamente miscigenada devido aos vários grupos migraram e migram de várias partes do mundo e se estabelecem aqui. Além disso, nossos pacientes e controles foram coletados em um centro de referência que atende várias cidades localizadas no nordeste brasileiro, muitas vezes separadas por centenas de quilômetros. Portanto, nossa população não é caracterizada como panmítica, um critério requerido para que se atinja o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A IL17A é uma citocina pró-inflamatória, e níveis elevados desta citocina têm sido encontrados em pacientes com LES (Tanasescu et al, 2010; Mok et al, 2010; Wong et al, 2008). Além disso, outros estudos demonstram que o alelo A do SNP rs2275913, situado na região promotora do gene *IL17A*, se associa com o aumento da produção desta citocina (Espinoza et al, 2011; Saraiva et al, 2013). Para a população estudada, o alelo A do polimorfismo -197(G/A) do gene *IL17A* mostrou associação com o desenvolvimento de LES (OR= 2.0186; p=0.0165), mostrando que existe uma possível relação entre a presença do alelo mutante e o risco de desenvolvimento do LES, possivelmente por aumentar a expressão de IL17A, acentuando assim, a resposta imune nos pacientes.

Em concordância com nossos resultados, outros estudos encontraram associação entre o SNP -197(G/A) do gene *IL17A* com o desenvolvimento de doenças autoimunes como a asma (Maalmi, et al., 2014), doença autoimune da

teróide (Yan et al., 2012), colite ulcerativa (Arisawa et al., 2008) e uma discreta associação com artrite reumatoide (Nordang et al., 2009).

Em contrapartida, outros estudos mostram a ausência de associação deste polimorfismo com o desenvolvimento de doenças autoimunes como síndrome primária antifosfolipídica (Popovic-Kuzmanovic et al., 2013), neuromielite óptica (Wang et al., 2012), doença de Beçeht (Shu et al., 2010) e doença inflamatória intestinal (Zhang et al., 2013).

Da mesma forma, o SNP rs763780 do gene IL17F, também se mostrou associado com o desenvolvimento do Lúpus entre os grupos analisados (OR=3.1163; p=0.0008). Mais uma vez, não encontramos até a presente data, dados na literatura que analisem este polimorfismo com LES. Por outro lado, encontramos resultados controversos em estudos de associação entre este polimorfismo com outras doenças autoimunes. Alguns trabalhos encontraram associação entre o SNP rs763780 e o desenvolvimento da doença de Graves (Guo et al., 2013), da doença autoimune da tireóide (Yan et al., 2012), asma (Qian et al., 2012), trombocitopenia imune crônica (Saitoh et al., 2011) e artrite reumatóide (Paradowska-Gorycka, et al., 2010). Contudo, outros estudos mostraram um efeito protetor deste polimorfismo no desenvolvimento da asma (Kawaguchi et al. 2006), doença inflamatória do intestino (Chen et al., 2009) e doença de Behçet (Shu et al. 2010).

Estas diferentes associações entre os SNPs rs2275913 da IL17A e rs763780 da IL17F em diferentes doenças autoimunes, podem ser devido às diferentes vias de sinalização envolvidas em cada uma das doenças, diferenças nos tecidos acometidos e também aspectos étnicos.

Apesar dos polimorfismos rs2275913 do gene *IL17A* e rs763780 do gene *IL17F* não estarem associados com os aspectos clínicos e com a atividade do LES, os dados mostram que estes SNPs podem ter influência na susceptibilidade da doença.

O gene *IL23R* codifica uma proteína transmembrana que parece com proteína *IL12-R $\beta$ 1*, formando o receptor da *IL23* (Parham et al., 2002). A *IL23* é uma citocina pró-inflamatória que faz parte da via de sinalização da linhagem Th17, estimulando sua proliferação e estabilização na resposta inflamatória (Gutcher et al., 2011).

As análises de associação entre o polimorfismo +2199 (A/C) do gene *IL23* (rs10889677) e a susceptibilidade ao LES mostraram que o alelo C confere 7 vezes mais risco no desenvolvimento da doença (OR=7,25;p=<0,0001). O alelo A está associado com aumento na produção da *IL23R*, estando também associado ao desenvolvimento da doença autoimune do intestino (Zwiers et al., 2012). Porém, o alelo C está associado com maior proliferação de células T quando comparado ao alelo A (Zheng et al., 2012), sendo provavelmente este o fator de susceptibilidade no desenvolvimento do lúpus por estar associado a uma maior acentuação da resposta imune.

Corroborando com nossos achados, alguns estudos o associaram com o SNP rs10889677 com o desenvolvimento doenças autoimunes como artrite reumatoide (Faragó et al., 2008; Szabo et al., 2013), doença de Chron (Faragó et al., 2008; Sáfrany et al., 2010; Szabo et al., 2013), espondilite anquilosante (Szabo et al., 2013), psoríase (Szabo et al., 2013) e doença de Grave (Huber et al., 2008).

Por outro lado, Safrani e colaboradores (2010) ao avaliar uma população LES positiva da Hungria, não encontraram associação entre o polimorfismo 2199 (A/C) do gene *IL23* com o desenvolvimento da doença, da mesma forma foi observado por Chen e colaboradores (2013) ao avaliar uma população chinesa. Além disso, este mesmo polimorfismo não foi associado ao desenvolvimento da síndrome de Sjögren (Safrani et al., 2009), esclerose múltipla (Liu et al., 2014) e espondilite anquilosante (Qian et al., 2013).

Os resultados mostram ausência de associação do polimorfismo do gene *IL23R* com o a atividade da doença e o desenvolvimento de características clínicas, sendo o mesmo encontrado para os polimorfismos rs2275913 do gene *IL17A* e rs763780 do gene *IL17F*. Portanto, fica evidenciado que os três genes que regulam a resposta da linhagem Th17 (*IL17A*, *IL17F* e *IL23R*) apresentam uma associação conjunta na susceptibilidade ao desenvolvimento do LES, o que sugere uma associação desta linhagem celular, e consequentemente seus mediadores imunológicos com a patologia.

Nenhum dos polimorfismos avaliados neste trabalho mostrou-se associado com a atividade do LES. A análise do polimorfismo por si só não considera as influências ambientais, psicológicas e genéticas na atividade da doença. Assim, seria necessária uma análise holística que envolvam todos estes fatores juntamente com os aspectos genéticos para retratar a real influência dos polimorfismos na atividade do LES.

Por fim, com os dados expostos, pôde-se observar que todos os polimorfismos avaliados neste trabalho se apresentaram associados com a susceptibilidade ao Lúpus, o que sugere que SNPs em genes de interleucinas pró-inflamatórias são fatores de risco para o desenvolvimento do LES na população do Nordeste brasileiro.

## 7. Conclusões

- Os polimorfismos IL2 -330 (T/G) (rs2069762), IL12 3'UTR +1188 (A/C) (rs3212227), IL17A -197(G/A) (rs2275913), IL17F +7488 (A/G) (rs763780), IL23R +2199 (A/C) (rs10889677) e TNF $\alpha$  -308 (G/A) (rs1800629) estão associados à susceptibilidade do LES;
- Nenhum dos polimorfismos avaliados no estudo mostrou associação com a atividade da doença;
- Quanto às características clínicas, o polimorfismo -308(G/A) do gene TNF $\alpha$  mostrou-se associado ao desenvolvimento de Serosite e o polimorfismo 3'UTR +1188 (A/C) do gene IL12B está associado com a presença de FAN e apresentou uma tendência para o desenvolvimento da Serosite;
- Os polimorfismos -330(T/G) do gene IL2, -197(G/A) do gene IL17A, +7488(A/G) do gene IL17F e +2199(A/C) do gene IL23R não se mostraram associados com o desenvolvimento das características clínicas do Lúpus Eritematoso Sistêmico.

## 8. Referências Bibliográficas

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. (2008) *Imunologia celular e molecular*. 6ª Ed. Elsevier. Rio de Janeiro p. 4-5.
- Adhya Z, Borozdenkova S, Karim M. (2011) The role of cytokines as biomarkers in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 26: 3273–3280.
- Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM. (2002) T-bet is a STAT1- induced regulator for IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* 3(6):549–557.
- Alarcon-Segovia D, Alarcon-Riquelme ME, Cardiel MH, Caeiro F, Massardo L, Villa AR and Pons-Estel BA. (2005). Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arth. & Rheum.*, 52(4).
- Al-Lamki RS, Wang J, Skepper JN, Thiru S, Pober JS, Bradley JR. (2001) Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants. *Lab Invest*. 81(11):1503–1515.
- Amsen D, Spilianakis CG, Flavell RA. (2009). How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made? *Current opinion in immunology*, 21(2), 153–60.
- Angelo HD, da Silva HA, Asano NM, Muniz MT, de Mascena Diniz Maia M, de Souza PR. (2012) Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism -308 G/A in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol*. 73(11):1166-70.
- Apostolidis S, Lieberman L, Kis-Toth K, Crispin J, Tsokos G. (2011) The dysregulation of cytokine networks in systemic lupus erythematosus. *J Interf Cytok Res* 31: 769–779
- Ardoin SP1 and Pisetsky DS. (2008) Developments in the scientific understanding of lupus. *Arthritis Res Ther.*;10(5):218.
- Arisawa T, Tahara T, Shibata T, Nagasaka M, Nakamura M, Kamiya Y, Fujita H, Nakamura M, Yoshioka D, Arima Y, et al. (2008) The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. *J Clin Immunol*.28(1):44-9.
- Asghar T, Yoshida S, Kennedy S, Negoro K, Zhuo W, Hamana S, Motoyama S, Nakago S, Barlow D, Maruo T. (2004) The tumor necrosis factor-alpha promoter -1031C polymorphism is associated with decreased risk of endometriosis in a Japanese population. *Hum Reprod* ;19:2509–14.
- Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, and Cantor H. (2000) Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science*, 287(5454): 860–864.
- Askanase A, Shum K and Mitnick H. (2012) Systemic lupus erythematosus: an overview. *Soc Work Health Care*. 51(7):576-86.
- Aune TM, Collins PL and Chang S. (2009) Epigenetics and T helper 1 differentiation. *Immunology*. 126(3):299–305.
- Azizah MR, Kuak SH, Ainol SS, Rahim MN, Normaznah Y, Norella K. (2004) Association of the tumor necrosis factor alpha gene polymorphism with susceptibility and clinical-immunological findings of systemic lupus erythematosus. *Asian Pac J Allergy Immunol* ;22:159–63

- Barros FC, Figueredo CMS, Fischer RG. (2006) Polimorfismo de citocinas relacionadas ao processo inflamatório periodontal. *R. Ci. Méd. Biol.*, Rio de Janeiro. 5(2):171-180.
- Baud V and Karin M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 11(9):372-7.
- Bazzoni F and Beutler B. (1996) The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.* 334:1717–25.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 441:235–238.
- Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA Jr. (1986) Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83(12):4533–4537.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, et al. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature.* 385:729–33.
- Boca AN, Talamonti M, Galluzzo M, Botti E, Vesa SC, Chimenti S, Buzoianu AD, Costanzo A. (2013) Genetic variations in IL6 and IL12B decreasing the risk for psoriasis. *Immunol Lett.* 156(1-2):127-31.
- Boehm U, Klamp T, Groot M and Howard JC. (1997) Cellular responses to interferon gamma. *Annual Review of Immunology*, vol. 15, pp. 749–795,.
- Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughon K, Cruciat C, Eberhard D, Gagneur J, Ghidelli S, et al. (2004) A physical and functional map of the human TNF $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol.* 6(2):97–105.
- Bradley JR and Pober JS. (1996) Prolonged cytokine exposure causes a dynamic redistribution of endothelial cell adhesion molecules to intercellular junctions. *Lab Invest.* 75(4):463–472.
- Bradley JR. (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 214:149–160.
- Brasil, Ministério da Saúde. Consulta Pública N° 3, de 16 de maio De 2012. Disponível em: <[http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cp\\_03\\_lupus\\_2012.pdf](http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cp_03_lupus_2012.pdf)> . Acesso em 11/04/2013.
- Cantor RM, Yuan J, Napier S, Kono N, Grossman JM, Hahn BH, Tsao BP. (2004) Systemic lupus erythematosus genome scan: support for linkage at 1q23, 2q33, 16q12-13, and 17q21-23 and novel evidence at 3p24, 10q23-24, 13q32, and 18q22-23. *Arthritis Rheum.* 50(10):3203-10,.
- Carroll MC. (2004) A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus. *Nature Reviews Immunology.* 4:825-831.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N and Williamson B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 72(9):3666–3670.
- Carvalho BTC, Lazzetti AV, Ferrarini MAG, Campos SO, Lazzetti MA, Carlasse FAMC. (2003) Sepsis por *Salmonella* associada à deficiência do receptor da interleucina-12 (IL-12R $\beta$ 1). *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro. 79(3):273-276.
- Cavanillas ML, Alcina A, Núñez C, de las Heras V, Fernández-Arquero M, Bartolomé M, de la Concha EG, Fernández O, Arroyo R, Matesanz F, et al.

- (2010) Polymorphisms in the IL2, IL2RA and IL2RB genes in multiple sclerosis risk. *European Journal of Human Genetics*, Málaga. 18(7):794-799.
- Chang SH and Dong C. (2007) A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. *Cell Res* ;17:435–40.
- Chang SH and Dong C. (2009) IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation. *Cytokine* ;46:7–11.
- Chang SH, Park H, Dong C. (2006) Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor. *J Biol Chem*;281:35603–7.
- Chang YH, Yu CW, Lai LC, Tsao CH, Ho KT, Yang SC, Lee H, Cheng YW, Wu TC, Shiau MY. (2010) Up-regulation of interleukin-17 expression by human papillomavirus type 16 E6 in nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 16:4800-4808.
- Chen B, Zeng Z, Xu L, Wu X, Yu J, Xue L, Hao Y, Wang Y, Sung JJ, Chen M, Hu P. (2011) IL23R +2199A/C polymorphism is associated with decreased risk of certain subtypes of gastric cancer in Chinese: a case-control study. *Cancer Epidemiol*. 35(2):165-9.
- Chen GM, Feng CC, Ye QL, Wang J, Cen H, Li R, Peng H, Zhou M, Leng RX, Fan YG, et al. (2013) Lack of association between IL-23R gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Inflamm Res*. Aug;62(8):791-5.
- Chen T, Liang W, Gao L, Wang Y, Liu Y, Zhang L, Zhang L. (2011) Association of single nucleotide polymorphisms in interleukin 12 (IL-12A and -B) with asthma in a Chinese population. *Hum Immunol*. 72(7):603-6.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor Foxp3.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. (2003) Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- $\beta$  induction of transcription factor foxp3. *Journal of Experimental Medicine*. vol. 198, no. 12, pp. 1875–1886.
- Chen X, Han S, Wang S, Zhou X, Zhang M, Dong J, Shi X, Qian N, Wang X, Wei Q, et al. (2009) Interactions of IL-12A and IL-12B polymorphisms on the risk of cervical cancer in Chinese women. *Clinical Cancer Research*. 15(1):400-405.
- Chiang EY, Kolumam GA, Yu X, Francesco M, Ivelja S, Peng I, Gribling P, Shu J, Lee WP, Refino CJ et al. (2009) Targeted depletion of lymphotoxin-a-expressing TH1 and TH17 cells inhibits autoimmune disease. *Nature Medicine*, vol. 15, no. 7, pp. 766–773.
- Chung SA, Taylor KE, Graham RR, Nititham J, Lee AT, Ortmann WA, Jacob CO, Alarcón-Riquelme ME, Tsao BP, Harley JB, et al. (2011) Differential genetic associations for systemic lupus erythematosus based on anti-dsDNA autoantibody production. *PLoS Genet* 7: e1001323.
- Cohen PL, Caricchio R, Abraham V, Camenisch TD, Jennette JC, Roubey RA, Earp HS, Matsushima G, Reap EA. (2002) Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *J Exp Med*. 196:135–140.
- Collison LW and Vignali DA. (2008) Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol. Rev*. 226:248–262.

- Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. (2007) The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 450:566–569.
- Constantini PK, Wawrzynowicz-Syczewska M, Clare M, Boron-Kaczmarek A, McFarlane IG, Cramp ME, Donaldson PT. (2002) Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy. *Liver*. 22:404–12.
- Crispin JC and Tsokos GC. (2008) Novel molecular targets in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 7:256–261.
- Crispín JC, Liossis SC, Kis-toth K, Lieberman LA, Kyttaris VC, Juang Y and Tsokos GC. (2011). Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med*. 16(2):47–57.
- Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, Kyttaris VC, Juang YT, Tsokos GC. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *The Journal of Immunology*, vol. 181, no. 12, pp. 8761–8766, 2008.
- Crow MK and Fredman SM. (1997) Cellular immunology. In: Klippel JH, Dieppe PA. *Rheumatology*. 2nd ed. Mosby; 6.1-7.8.
- Cruvinel WM, Mesquita Jr. D, Araújo JAP, Salmazi KC, Kállas EG, Andrade LEC. (2008) Células T regulatórias naturais (Tregs) em doenças reumáticas. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 48(6):342-355.
- Dae'ron M, Latour S, Malbec O, Espinosa E, Pina P, Pasmans S and Fridman WH. (1995) The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIB, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity*. 3:635–646.
- Daniels MA, Teixeira E, Gill J, Hausmann B, Roubaty D, Holmberg K, Werlen G, Holländer GA, Gascoigne NR, Palmer E. (2006) Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signaling. *Nature*. 444(7120):724–729.
- Davis L, Hutcheson J, Mohan C. (2011) The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. *J Interferon Cytokine Res* 31: 781–789.
- Dean AG, Arner TG, Sunki GG, Friedman R, Lantinga M, Sangam S, Zubieta JC, Sullivan KM, Brendel KA, Gao Z, Fontaine N, et al. (2011) Epi Info™, a database and statistics program for public health professionals. CDC, Atlanta, GA, USA.
- del Prete G. (1992) Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy*. 47(5):450–455.
- Dellavance A, Júnior AG, Nuccitelli B, Taliberti BH, von Mühlen CA, Bichara CDA, Santos CHR, Bueno C, Yano CM, Manguera CLP et al. (2009) 3º Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 (FAN). Recomendações para padronização do ensaio de pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2, controle de qualidade e associações clínicas. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 49(2):89-109.
- Diehl S and Rincón M. (2002) The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation," *Molecular Immunology*. 39(9): 531–536,.
- Diehl S, Anguita J, Hoffmeyer A, Zapon T, Ihle JN, Fikrig E, Rincón M. (2000) Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity*. 13(6):805–815.

- Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, Ansel KM. (2007) Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nature Immunology*. 8(2):145–153.
- Dong C. (2009) Differentiation and function of pro-inflammatory Th17 cells. *Microbes Infect* ;11:584–8
- Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC, Ranchin B, Fabien N, Cochat P, Pouteil-Noble C, Trolliet P. (2009) Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nature Immunology*. 10(7):778–785.
- Duarte AA. (2004) *Colagenoses e a Dermatologia*. São Paulo: Ed. do Autor; .
- Dubin P and Kolls JK. (2009). Interleukin-17A and Interleukin-17F: A Tale of Two Cytokines. *Immunity*. 30:9-11.
- Eck MJ, and Sprang SR. (1989) The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem*. 264(29):17595-605.
- El-Shafey EM, El-Nagar GF, El-Bendary AS, Sabry AA, Selim AG. (2008) Serum soluble interleukin-2 receptor alpha in systemic. *Iranian Journal of Kidney Diseases*. 2(2):80-85.
- Esplugues E, Huber S, Gagliani N, Hauser AE, Town T, Wan YY, O'Connor W Jr, Rongvaux A, Van Rooijen N, Haberman AM, et al. (2011) Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature*. 475:514–518
- Faragó B, Magyari L, Sáfrány E, Csöngéi V, Járomi L, Horvatovich K, Sipeky C, Maász A, Radics J, Gyetvai A, et al. (2008) Functional variants of interleukin-23 receptor gene confer risk for rheumatoid arthritis but not for systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2008 Feb;67(2):248-50.
- Fedetz M, Ndagire D, Fernandez O, Leyva L, Guerrero M, Arnal C, Lucas M, Izquierdo G, Delgado C, Alcina A, et al. (2009) Multiple sclerosis association study with the TENR-IL2-IL21 region in a Spanish population. *Tissue Antigens*. Sep;74(3):244-7.
- Feldman CH, Hiraki LT, Liu J, Fischer MA, Solomon DH, Alarcón GS, Winkelmayer WC, Costenbader KH. (2013) Epidemiology and sociodemographics of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis among US adults with Medicaid coverage, 2000-2004. *Arthritis Rheum*. 65(3):753-63.
- Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, Goodman K, Morandi B, Muller WA, Moretta A, Munz C. (2004) The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J. Immunol*. 172: 1455-1462.
- Fichna M1, Zurawek M, Fichna P, Ziółkowska-Suchanek I, Januszkiewicz D, Nowak J. (2013) Polymorphic variant at the IL2 region is associated with type 1 diabetes and may affect serum levels of interleukin-2. *Mol Biol Rep*. Dec;40(12):6957-63.
- Fieschi C, Dupuis S, Catherinot E, Feinberg J, Bustamante J, Breiman A, Altare F, Baretto R, Le Deist F, Kayal S et al. (2003) Low penetrance, broad resistance, and favorable outcome of interleukin 12 receptor  $\beta$ 1 deficiency: medical and immunological implications. *J. Exp. Med*. 197:527–535.
- Franceschi DAS, Viel DO, Sell AM, Tsuneto LT, Visentainer JEL. (2009) Otimização de metodologia PCR-SSP para identificação de polimorfismos

- genéticos de TNF e IL2. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 31(4):1-6.
- Fujishima S, Watanabe H, Kawaguchi M, Suzuki T, Matsukura S, Homma T, Howell BG, Hizawa N, Mitsuya T, Huang SK, et al. (2010) Involvement of IL-17F via the induction of IL-6 in psoriasis. *Arch Dermatol Res*. 302(7):499-505.
- Fujita T, Takaoka C, Matsui H, Taniguchi T. (1983) Structure of the human interleukin 2 gene. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 80:7437-7441.
- Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. (2009) *Nature Reviews Immunology*. 9(8):556– 567,
- Garcia JBS, Issy AM, Sakata RK. (2002) Citocinas e anestesia. *Revista Brasileira de Anestesiologia, São Paulo*. 52(1):86-100.
- Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RG, Huizinga TW, Kimberly RP. (2001) Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 166(6):3915-22.
- Gill J, Malin M, Sutherland J, Gray D, Hollander G, Boyd R. (2003) Thymic generation and regeneration. *Immunological Reviews*. 195:28–50.
- Giugno KM, Machado DC, Amantéa SL, Barreto SSM. (2004) Concentrações de interleucina-2 na secreção nasofaríngea de crianças com bronquiolite viral aguda pelo vírus respiratório sincicial. *Jornal de Pediatria*. 84(4):315-320.
- Glas J, Seiderer J, Wagner J, Olszak T, Fries C, Tillack C, Friedrich M, Beigel F, Stallhofer J, Steib C, et al. (2012) Analysis of IL12B gene variants in inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 7(3):e34349.
- Glimcher LH and Murphy KM. (2000) Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes and Development*. 14(14):1693–1711.
- Gonzales JR, Kobayashi T, Michel J, Mann M, Yoshie H, Meyle J. (2004) Interleukin-4 gene polymorphisms in Japanese and Caucasian patients with aggressive periodontitis. *Journal of Clinical*. 31(5):384-389.
- Guarnizo-Zuccardi P, Lopez Y, Giraldo M, Garcia N, Rodriguez L, Ramirez L, et al. (2007) Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* ;70:376–82
- Guarnizo-Zuccardi P, Lopez Y, Giraldo M, Garcia N, Rodriguez L, Ramirez L, Uribe O, Garcia L, Vasquez G. (2007) Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*. 70(5):376-82.
- Gunsten S, Mikols CL, Grayson MH, Schwendener RA, Agapov E, Tidwell RM, Cannon C. L, Brody SL, Walter MJ. (2008) IL-12 p80-dependent macrophage recruitment primes the host for increased survival following a lethal respiratory viral infection. *Immunology*. 126: 500-513.
- Guo T, Huo Y, Zhu W, Xu F, Liu C, Liu N, Cao M, Cui B, Ning G. (2013) Genetic association between IL-17F gene polymorphisms and the pathogenesis of Graves' Disease in the Han Chinese population. *Gene*. Jan 10;512(2):300-4
- Gutcher I, Donkor MK, Ma Q, Rudensky AY, Flavell RA, Li MO. (2011) Autocrine transforming growth factor-beta1 promotes in vivo Th17 cell differentiation. *Immunity*, 34:396–408.
- Hall MA, McGlinn E, Coakley G, Fisher SA, Boki K, Middleton D, Kaklamani E, Moutsopoulos H, Loughran TP Jr, Ollier WE, et al. (2000) Genetic

- polymorphism of IL-12 p40 gene in immune-Mediated disease. *Genes and Immunity*. (3):219-24.
- Halonen SK, Taylor GA, Weiss LM. (2001) Gamma interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* in astrocytes is mediated by IGTP. *Infection and Immunity*. 69, (9):5573–5576.
- Han JW, Zheng HF, Cui Y, Sun LD, Ye DQ, Hu Z, Xu JH, Cai ZM, Huang W, Zhao GP, et al. (2009) Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 41: 1234–1237.
- Han SS, Cho EY, Lee TS, Kim JW, Park NH, Song YS, Kim JG, Lee HP, Kang SB. (2008) Interleukin-12 p40 gene (IL12B) polymorphisms and the risk of cervical cancer in Korean women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 140(1):71-5..
- Harley JB, Alarcon-Riquelme ME, Criswell LA, Jacob CO, Kimberly RP, Moser KL, Tsao BP, Vyse TJ, Langeveld CD, Nath SK, et al. (2008) Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet* 40: 204–210.
- Hayashi R, Tahara T, Shiroeda H, Saito T, Nakamura M, Tsutsumi M, Shibata T, Arisawa T.(2013)Influence of IL17A polymorphisms (rs2275913 and rs3748067) on the susceptibility to ulcerative colitis.*Clin Exp Med*.13(4):239-44.
- Hirankarn N, Avihingsanon Y, Wongpiyabovorn J. (2007) Genetic susceptibility to SLE is associated with TNF-alpha gene polymorphism -863, but not -308 and -238, in Thai population. *Int J Immunogenet*;34:425–30.
- Hochberg MC. (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 40(9):1725.
- Hom G, Graham RR, Modrek B, Taylor KE, Ortmann W, Garnier S, Lee AT, Chung SA, Ferreira RC, Pant PV et al. (2008) Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM- ITGAX. *N Engl J Med* 358: 900–909.
- Huang CM, Huo AP, Tsai CH, Chen CL, Tsai FJ. (2006) Lack of association of interleukin-6 and interleukin-8 gene polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 20:255-259.
- Huang D, Cancilla MR, Morahan G. (2000) Complete primary structure, chromosomal localisation, and definition of polymorphisms of the gene encoding the human interleukin-12 p40 subunit. *Genes Immun*. 1(8):515-20.
- Huang ZQ, Wang JL, Pan GG, Wei YS. (2011) Association of single nucleotide polymorphisms in IL-12 and IL-27 genes with colorectal cancer risk. *Clinical Biochemistry*.45(1-2):54-9
- Huber AK, Jacobson EM, Jazdzewski K, Concepcion ES, Tomer Y. (2008) Interleukin (IL)-23 receptor is a major susceptibility gene for Graves' ophthalmopathy: the IL-23/T-helper 17 axis extends to thyroid autoimmunity.*J Clin Endocrinol Metab*. 93(3):1077-81.
- Huber AK1, Jacobson EM, Jazdzewski K, Concepcion ES, Tomer Y.(2008) Interleukin (IL)-23 receptor is a major susceptibility gene for Graves' ophthalmopathy: the IL-23/T-helper 17 axis extends to thyroid autoimmunity.*J Clin Endocrinol Metab*.93(3):1077-81.

- Hunter CA. (2005) New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat. Rev. Immunol.* 5:521–531.
- Hwang ES, Szabo SJ, Schwartzberg PL, Glimcher LH. (2005) T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science*. 307(5708):430–433.
- Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, Fujikado N, Tanahashi Y, Akitsu A, Kotaki H et al. (2009) Differential Roles of Interleukin-17A and -17F in Host Defense against Mucoepithelial Bacterial Infection and Allergic Responses. *Immunity*, v.30, p.108–119.
- Ivanov IL, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelletier A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. (2006) The Orphan Nuclear Receptor ROR $\gamma$ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell*. 126(6):1121–1133.
- Iwasaki A. and Medzhitov R. (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 5(10):987–995.
- Jimenez S, Cervera R, Font J, Ingelmo M. (2003) The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Clin Rev Allergy Immunol* 25: 3–12
- Jiménez-Morales S, Velázquez-Cruz R, Ramírez-Bello J, Bonilla-González E, Romero-Hidalgo S, Escamilla-Guerrero G, Cuevas F, Espinosa-Rosales F, Martínez-Aguilar NE, Gómez-Vera J, et al. (2009) Tumor necrosis factor- $\alpha$  is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population. *Hum Immunol* ;70:251–6
- Johansson S, Lie BA, Thorsby E, Undlien DE. The polymorphism in the 3'untranslated region of IL12B has a negligible effect on the susceptibility to develop type I diabetes in Norway. *Immunogenetics, Norway*, v. 53, n. 7, p.603-605, 2001.
- Jones LL and Vignali DA. (2011) Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/ receptor superfamily. *Immunol. Res.* 51, 5–14
- Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. (1996) Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells," *Immunity*, vol. 4, no. 3, pp. 313– 319.
- Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. (1996) Impaired IL-12 responses and enhanced development of TH2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382, 174–177.
- Kastelein RA, Hunter CA, Cua DJ. (2007) Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 221–242.
- Kawaguchi M, Kokubu F, Fujita J, Huang SK, Hizawa N. (2009) Role of Interleukin-17F in Asthma. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*. 8:383-389.
- Kim ES, Kim SW, Moon CM, Park JJ, Kim TI, Kim WH, Cheon JH. (2012) Interactions between IL17A, IL23R, and STAT4 polymorphisms confer susceptibility to intestinal Behcet's disease in Korean population. *Life Sci.* 22;90(19-20):740-6.
- Kim HP, Imbert J, Leonard WJ. (2006) Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 17, no. 5, pp. 349–366.
- Kim YK, Pyo CW, Choi HB, Kim SY, Kim TY, Kim TG. (2007) Associations of IL-2 and IL-4 gene polymorphisms with psoriasis in the Korean population. *J Dermatol Sci.* Nov;48(2):133-9.

- Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. (2009) Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nature Reviews Immunology*, 9(12): 833–844.
- Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G. (1989) Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170, 827–845.
- Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK (2007) IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T H17 cells. *Nature*. 448(7152):484–487.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev Immunol*;27:485–517.
- Kozyrev SV, Abelson AK, Wojcik J, Zaghlool A, Linga Reddy MV, Sanchez E, Gunnarsson I, Svenungsson E, Sturfelt G, Jönsen A, et al. (2008) Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 40: 211–216.
- Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA, Abraham LJ. (2000) Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine*. 12(2):110-9.
- Kuestner RE, Taft DW, Haran A, Brandt CS, Brender T, Lum K, Harder B, Okada S, Ostrander CD, Kreindler JL, et al. (2007) Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F. *J Immunol* ;179:5462–73.
- Kwiatkowski D, Hill AV, Sambou I, Twumasi P, Castracane J, Manogue KR, Cerami A, Brewster DR, Greenwood BM. (1990) TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet*;336(8725):1201–1204
- Langrish CL, McKenzie BS, Wilson NJ, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Cua DJ. (2004) IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 202, 96–105.
- Lazarevic V, Chen X, Shim JH, Hwang ES, Jang E, Bolm AN, Oukka M, Kuchroo VK, Glimcher LH. (2011) T-bet represses TH 17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding ROR $\gamma$ t. *Nature Immunology*. 12(1):96–104
- Lee YH, Harley JB, Nath SK. (2006) Meta-analysis of TNF-alpha promoter -308 A/G polymorphism and SLE susceptibility. *Eur J Hum Genet* ;14:364–71.
- Leonard WJ and Spolski R. (2005) Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nature Reviews Immunology*. 5(9):688–698.
- Leonard WJ, Depper JM, Crabtree GR, Rudikoff S, Pumphrey J, Robb RJ, Krönke M, Svetlik PB, Pfeffer NJ, Waldmann TA, et al.. (1984) Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor. *Nature*. 311:626–631
- Leonard WJ. (1996) The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: defective cytokine receptor signaling *Annu Rev Med.* 47: 229–239.
- Leonardi CL, Powers JL, Matheson RT, Goffe BS, Zitnik R, Wang A, Gottlieb AB. (2003) Etanercept as monotherapy in patients with psoriasis. *New Eng. J. Med.* 349: 2014–2022.

- Lewkowicz N, Kur B, Kurnatowska A, Tchorzewski H, Lewkowicz P. (2011) Expression of Th1/Th2/Th3/Th17-related genes in recurrent aphthous ulcers. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 59(5):399-406
- Li Y, Liang WB, Li C, Gao LB, Zhou B, Wang YY, Lv ML, Song YP, Zhang L. (2010) The association between interleukin-23 receptor gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus. *DNA Cell Biol*. Feb;29(2):79-82.
- Lieberman LA and Tsokos GC. (2010) The IL-2 defect in systemic lupus erythematosus disease has an expansive effect on host immunity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Boston, p.1-6.
- Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD, Nguyen BV, Gadina M, Sher A, Paul WE, et al. (2001) T-bet is rapidly induced by interferon- $\gamma$  in lymphoid and myeloid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(26):15137–15142.
- Lin YJ, Wan L, Sheu JJC, Huang CM, Lin CW, Lan YC, Tsai FJ. (2008). G/T polymorphism in the interleukin-2 exon 1 region among Han Chinese systemic lupus erythematosus patients in Taiwan. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 129(1), 36–9.
- Lit LC, Wong CK, Tam LS, Li EK, Lam CW. (2006) Raised plasma concentration and ex vivo production of inflammatory chemokines in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, v. 65, n. 2, p. 209-15.
- Liu M, Hu X, Wang Y, Chen X, Wu J.(2014) Association of IL-23 and its receptor gene single nucleotide polymorphisms with Multiple Sclerosis in Chinese Southern Population. *Int J Neurosci*.epub.
- Lowenthal JW, Zubler RH, Nabholz M, MacDonald HR. (1985) Similarities between interleukin-2 receptor number and affinity on activated B and T lymphocytes. *Nature* 315: 669-672.
- Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. (2012). CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology*, 2012, 925135.
- Luettiq B, Decker T, Lohmann-Matthes ML. (1989) Evidence for the existence of two forms of membrane tumor necrosis factor: an integral protein and a molecule attached to its receptor. *J Immunol*.143:4034–8.
- Lugo-Villarino G, Maldonado-Lopez R, Possemato R, Penaranda C, Glimcher LH. (2003) T-bet is required for optimal production of IFN- $\gamma$  and antigen-specific T cell activation by dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100(13):7749–7754.
- Ma A, Koka R, Burkett P. (2006) Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol*.;24:657–679.
- Ma CY, Jiao YL, Zhang J, Yang QR, Zhang ZF, Shen YJ, Chen ZJ, Zhao YR. (2010) Elevated plasma level of HMGB1 is associated with disease activity and combined alterations with IFN- $\alpha$  and TNF- $\alpha$  in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* ;32(2):395–412.
- Maalmi H, Beraies A, Charad R, Ammar J, Hamzaoui K, Hamzaoui A. (2014) IL-17A and IL-17F genes variants and susceptibility to childhood asthma in Tunisia. *J Asthma*. Jan 23
- Machado PRL, Araújo MIA, Carvalho L, Carvalho EM. (2004) Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, Rio de Janeiro. 79(6):647-664.
- Mackenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. (2006) Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends in Immunology*. 27:17-23.

- Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV and Bayry J. (2012) Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *The Am J of Path.* 181(1): 8-18.
- Man BL, Mok CC. (2005) Serositis related to systemic lupus erythematosus: prevalence and outcome. *Lupus* ;14:822–6.
- Mangale D, Kariuki SN, Chrabot BS, Kumabe M, Kelly JA, Harley JB, James JA, Sivils KL, Niewold TB. (2013) Familial aggregation of high tumor necrosis factor alpha levels in systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol.*;2013:267430
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. (2006) Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, 441:231–234
- Mark KS, Trickler WJ, Miller DW. (2001) Tumor necrosis factor-alpha induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Therap*;297(3):1051–1058
- Martinez GJ, Nurieva RI, Yang XO, Dong C. (2008) Regulation and function of proinflammatory TH17 cells. *Ann NY Acad Sci* ;1143:188–211.
- Matusevicius D, Kivisaar P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S and Link H. (1999). Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 5, 101–104.
- McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. (2006) Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol.* 27;17-23.
- Messadi DV, Poher JS, Fiers W, Gimbrone MA Jr, Murphy GF. (1987) Induction of an activation antigen on postcapillary venular endothelium in human skin organ culture. *J Immunol*;139:1557–1562.
- Mevorach D, Zhou JL, Song X, Elkon KB. (1998) Systemic exposure to irradiated apoptotic cells induces autoantibody production. *J Exp Med* 188:387–392.
- Michel M, Johanet C, Meyer O, Frances C, Wittke F, Michel C, Arfi S, Tournier-Lasserre E, Piette JC. (2001). Familial lupus erythematosus. Clinical and immunologic features of 125 multiplex families. *Medicine.* 80(3), 153–158
- Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. (2009) Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med.* 361:888–898
- Miossec P. (2003) Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis and Rheumatism*, vol. 48, no. 3, pp. 594–601.
- Miteva LD, Manolova IM, Ivanova MG, Rashkov RK, Stoilov RM, Gulubova MV, Stanilova SA. (2012) Functional genetic polymorphisms in interleukin-12B gene in association with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* Jan;32(1):53-9.
- Mok CC. (2010) Biomarkers for lupus nephritis: a critical appraisal. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 638413
- Morahan G, Kaur G, Singh M, Rapthap CC, Kumar N, Katoch K, Mehra NK, Huang D. (2007) Association of variants in the IL12B gene with leprosy and tuberculosis. *Journal Compilation, Australia*, v. 69, n. 1, p.234-236,.
- Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L and Reddi AH. (2003) Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews.* 14(2):155–174.
- Moser KL, Kelly JA, Lessard CJ, Harley JB. (2009) Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes and immunity*, 10(5), 373–379.

- Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, et al. (1997) Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- $\alpha$ . *Nature*;385:733–6.
- Müller-Berghaus J, Kern K, Paschen A, Nguyen XD, Klüter H, Morahan G, Schadendorf D. (2004) Deficient IL-12p70 secretion by dendritic cells based on IL12B promoter genotype. *Genes And Immunity*, Germany, p.431-434,.
- Munro JM, Pober JS, Cotran RS. (1989) Tumor necrosis factor and interferon- $\gamma$  induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of *Papio anubis*. *Am J Pathol*;135:121–133
- Murphy KM and Reiner SL. (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nature Rev. Immunol.* 2, 933–944.
- Murray HW, Rubin BY, Carriero SM. (1985) Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: Oxygen- dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology*. 134(3):1982–1988.
- Nakashima CAK, Galhardo AP, Silva JFM, Fiorenzano GR, Santos ABS, Leite MFS, Nogueira MA, Menolli PVS, Menolli RA. (2011) Incidência e aspectos clínico-laboratoriais do Lúpus eritematoso sistêmico em cidade do Sul do Brasil. *Rev. Bras. Reumatol.* vol.51 no.3.
- Nalbandian A, Crispín JC, Tsokos GC (2009) Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. *Clin Exp Immunol*;157:209–215.
- Nelson BH. (2004) IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol.* 172(7):3983–8.
- Niedbala W, Wei XQ, Cai B, Hueber AJ, Leung BP, McInnes IB, Liew FY (2007) IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur. J. Immunol.* 37, 3021–3029.
- Nikaido T, Shimizu A, Ishida N, Sabe H, Teshigawara K, Maeda M, Uchiyama T, Yodoi J, Honjo T. (1984) Molecular cloning of cDNA encoding human interleukin-2 receptor. *Nature*, 311:631–635.
- Nisticò L, Giorgi G, Giordano M, Galgani A, Petrone A, D'Alfonso S, Federici M, Di Mario U, Pozzilli P, Buzzetti R, et al. (2002) IL12B polymorphism and type I diabetes in the Italian population: a case-control study. *American Diabetes Association, Rome*, v. 51, n. 5, p.1649-1650,.
- Nordang GB, Viken MK, Hollis-Moffatt JE, Merriman TR, Førre ØT, Helgetveit K, Kvien TK, Lie BA. (2009) Association analysis of the interleukin 17A gene in Caucasian rheumatoid arthritis patients from Norway and New Zealand. *Rheumatology (Oxford)*. Apr;48(4):367-70.
- Nurnberger W, Platonov A, Stannigel H, Beloborodov VB, Michelmann I, von Kries R, Burdach S, Göbel U. (1995) Definition of a new score for severity of generalized *Neisseria meningitidis* infection. *Eur J Pediatr.* 154(11):896–900.
- Ohl K and Tenbrock K. (2011) Inflammatory Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011:ID 432595, 14 pages.
- Oka A, Mabuchi T, Ikeda S, Terui T, Haida Y, Ozawa A, Yatsu K, Kulski JK, Inoko H.(2013) IL12B and IL23R gene SNPs in Japanese psoriasis. *Immunogenetics*. Nov;65(11):823-8.

- Oka A, Mabuchi T, Ikeda S, Terui T, Haida Y, Ozawa A, Yatsu K, Kulski JK, Inoko H.(2013) IL12B and IL23R gene SNPs in Japanese psoriasis. *Immunogenetics*. 65(11):823-8.
- Onishi RM and Gaffen SL. (2010) Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*. 129:311–321.
- Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K et al. (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715–725.
- Pai SY, Truitt ML, Ho IC. (2004) GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(7):1993–1998.
- Paradowska-Gorycka A, Wojtecka-Lukasik E, Trefler J, Wojciechowska B, Lacki JK, Maslinski S. (2010) Association between IL-17F gene polymorphisms and susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis (RA). *Scand J Immunol*. 72(2):134-41.
- Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, et al. (2002) A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R $\beta$ 1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J. Immunol*. 168, 5699–5708.
- Parks CG, Pandey JP, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS, Feghali-Bostwick CA, Cooper GS. (2004) Genetic polymorphisms in tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF-beta in a population-based study of systemic lupus erythematosus: associations and interaction with the interleukin-1alpha-889 C/T polymorphism. *Hum Immunol* ;65:622–31
- Pennica D, Hayflick JS, Bringman TS, Palladino MA, Goed- del DV. (1985) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82(18):6060–6064.
- Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV. (1984) Human tumor necrosis factor: precursor structure, cDNA cloning, expression, and homology to lymphotoxin. *Nature*.;312:724–9.
- Pober JS, Bevilacqua MP, Mendrick DL, Lapierre LA, Fiers W, Gimbrone MA Jr. (1986) Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J Immunol*. 136:1680–1687.
- Popovic-Kuzmanovic D, Novakovic I, Stojanovich L, Aksentijevich I, Zogovic N, Tovilovic G, Trajkovic V. (2013) Increased activity of interleukin-23/interleukin-17 cytokine axis in primary antiphospholipid syndrome. *Immunobiology*. 218(2):186-91.
- Presky DH, Yang H, Minetti LJ, Chua AO, Nabavi N, Wu CY, Gately MK, Gubler U (1996) A functional interleukin-12 receptor complex is composed of two  $\beta$ -type cytokine receptor subunits. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 14002–14007.
- Pyo CW, Hur SS, Kim YK, Choi HB, Hong YS, Kim DW, Kim CC, Kim HK, Kim TG.(2003) Polymorphisms of IL-1B, IL-1RN, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IFN-gamma genes in the Korean population. *Hum Immunol*. Oct;64(10):979-89.
- Qian BP, Jiang J, Ji ML, Wang B, Yu Y, Qiu Y.(2013) Lack of associations between two previously identified susceptible single nucleotide polymorphisms of interleukin-23 receptor gene and ankylosing spondylitis: a

- replication study in a Chinese Han population. *BMC Musculoskelet Disord*.17:14:190.
- Qian Y, Liu C, Hartupée J, Altuntas CZ, Gulen MF, Jane-Wit D, Xiao J, Lu Y, Giltaiy N, Liu J, et al. (2007) The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nat Immunol* ;8:247–56.
- Qin H, Wang L, Feng T, Elson CO, Niyongere SA, Lee SJ, Reynolds SL, Weaver CT, Roarty K, Serra R, et al. (2009) TGF- $\beta$  promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3. *Journal of Immunology*. 183(1):97–105.
- Queiroz DM, Oliveira AG, Saraiva IE, Rocha GA, Rocha AM, das Graças Pimenta Sanna M, Guerra JB, Dani R, Ferrari Mde L, Castro LP. (2009) Immune response and gene polymorphism profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 15(3):353-8.
- Rhoades KL1, Golub SH, Economou JS.( 1992) The regulation of the human tumor necrosis factor alpha promoter region in macrophage, T cell, and B cell lines. *J Biol Chem*. 5;267(31):22102-7.
- Robak T, Gladalska A, Stepień H. (1998) The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Eur Cytokine Netw*;9(2):145–154.
- Robinson DS and O'Garra A. (2002) Further checkpoints in TH1 development. *Immunity* 16, 755–758.
- Rocha AM, De Souza C, Rocha GA, De Melo FF, Saraiva IS, Clementino NC, Marino MC, Queiroz DM. (2010) IL1RN VNTR and IL2-330 polymorphic genes are independently associated with chronic immune thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 150(6):679-84.
- Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U, Sinigaglia F. (1997) Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J. Exp. Med*. 185, 825–831.
- Rosado S, Rua-Figueroa I, Vargas JA, Garcia-Laorden MI, Losada-Fernandez I, Martín-Donaire T, Perez-Chacon G, Rodriguez-Gallego C, Naranjo-Hernandez A, Ojeda-Bruno S, et al. (2008) Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus from the Canary Islands. *Int J Immunogenet*. 35(3):235-42.
- Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG, Denizot F, Golstein P (1993) CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol*; 150:5445–56
- Ruddy MJ, Wong GC, Liu XK, Yamamoto H, Kasayamas S, Kirkwood KC, Gaffen SL. (2004) Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-  $\alpha$  is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members. *J Biol Chem*;279:2559–67.
- Safrany E, Hobor R, Jakab L, Tarr T, Csöngéi V, Jaromi L, Sipeky C, Valasek A, Zeher M, Fust G, et al. (2010) Interleukin-23 receptor gene variants in Hungarian systemic lupus erythematosus patients. *Inflamm Res*. Feb;59(2):159-64
- Sáfrány E, Pazár B, Csöngéi V, Járomi L, Polgár N, Sipeky C, Horváth IF, Zeher M, Poór G, Melegh B.(2009) Variants of the IL23R gene are associated with ankylosing spondylitis but not with Sjögren syndrome in Hungarian population samples. *Scand J Immunol*. 70(1):68-74.

- Safrany E, Szabo M, Szell M, Kemeny L, Sumegi K, Melegh BI, Magyar L, Matyas P, Figler M, Weber A, et al. (2013) Difference of interleukin-23 receptor gene haplotype variants in ulcerative colitis compared to Crohn's disease and psoriasis. *Inflamm Res*. Feb;62(2):195-200.
- Saitoh T, Tsukamoto N, Koiso H, Mitsui T, Yokohama A, Handa H, Karasawa M, Ogawara H, Nojima Y, Murakami H. (2011) Interleukin-17F gene polymorphism in patients with chronic immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol*. Sep;87(3):253-8
- Sánchez E, Morales S, Paco L, López-Nevot MA, Hidalgo C, Jiménez-Alonso J, Torres B, González-Gay MA, Callejas JL, Ortego-Centeno N, et al. (2005) Interleukin 12 (*IL12B*), interleukin 12 receptor (*IL12RB1*) and interleukin 23 (*IL23A*) gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 44(9):1136-9.
- Santos MJ, Carmona-Fernandes D, Caetano-Lopes J, Perpétuo IP, Vidal B, Capela S, Canas da Silva J, Fonseca JE. (2011) TNF promoter -308 G>A and LTA 252 A>G polymorphisms in Portuguese patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* . <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-011-1950-> [Online First, 5 May 2011]
- Seegers D, Borm ME, van Belzen MJ, Mulder CJ, Bailing J, Crusius JB, Meijer JW, Wijmenga C, Peña AS, Bouma G. (2003) IL12B and IRF1 gene polymorphisms and susceptibility to celiac disease. *Eur J Immunogenet*, Amsterdam, v. 30, n. 6, p.421-425.
- Seegers D, Zwiers A, Strober W, Pena AS, Bouma G. A TaqI polymorphism in the 3' UTR of the IL-12 p40 gene correlates with increased IL-12 secretion. *Genes Immun* 2002;3:419-23
- Seiderer J, Elben I, Diegelmann J, Glas J, Stallhofer J, Tillack C, Pfennig S, Jürgens M, Schmechel S, Konrad A, et al. (2008) Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 14(4):437-45.
- Seigel LJ, Harper ME, Wong-Staal F, Gallo RC, Nash WG, O'Brien SJ. (1984) Gene for T-cell growth factor: location on human chromosome 4q and feline chromosome B1. *Science* 223: 175-178.
- Sestak AL, Shaver TS, Moser KL, Neas BR, Harley JB. (1999) Familial aggregation of lupus and autoimmunity in an unusual multiplex pedigree. *J Rheumatol* 26: 1495–1499.
- Shahbazi M, Roshandel D, Ebadi H, Fathi D, Zamani M, Boghaee M, Mohammadhoseeni M, Rshaidbaghan A, Bakhshandeh A, Shahbazi S. (2010) High frequency of the IL-2 -330 T/HLA-DRB1\*1501 haplotype in patients with multiple sclerosis. *Clin Immunol*. Oct;137(1):134-8.
- Shahram F, Nikoopour E, Rezaei N, Saeedfar K, Ziaei N, Davatchi F, Amirzargar A. (2011) Association of interleukin-2, interleukin-4 and transforming growth factor-beta gene polymorphisms with Behcet's disease. *Clin Exp Rheumatol*. Jul-Aug;29(4 Suppl 67):S28-31
- Sharon M, Klausner RD, Cullen BR, Chizzonite R, Leonard WJ. (1986) Novel interleukin-2 receptor subunit detected by cross-linking under high-affinity conditions *Science*, 234, pp. 859–863.
- Shen F, Ruddy MJ, Plamondon P, Gaffen SL. (2005) Cytokines link osteoblasts and inflammation: microarray analysis of interleukin-17- and TNF-alpha-induced genes in bone cells. *J Leukoc Biol* ;77:388–99

- Shih DQ, Targan SR and McGovern D. (2008) Recent advances in IBD pathogenesis: genetics and immunobiology. *Current Gastroenterology Reports*. 10(6):568–575.
- Shu Q, Yang P, Hou S, Li F, Chen Y, Du L, Jiang Z. (2010) Interleukin-17 gene polymorphism is associated with Vogt-Koyanagi-Harada syndrome but not with Behçet's disease in a Chinese Han population. *Hum Immunol*. Oct;71(10):988-91.
- Slowik MR, De Luca LG, Fiers W, Pober JS. (1993) Tumor necrosis factor activates human endothelial cells through the p55 tumor necrosis factor receptor but the p75 receptor contributes to activation at low tumor necrosis factor concentration. *AmJ Pathol*;143(6):1724–1730.
- Smith KA. (1988) Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 240: 1169-1176,.
- Sokol CL, Chu NQ, Yu S, Nish SA, Laufer TM, Medzhitov R. (2009) Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nature Immunology*. 10(7):713–720.
- Solomou EE, Juang YT, Gourley MF, Kammer GM, Tsokos GC. (2001) Molecular basis of deficient IL-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. 166(6):4216-4222
- Steinke JW and Borish L. (2001) Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respiratory Research*, vol. 2, no. 2, pp. 66–70.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 21:685–711.
- Suárez A, López P, Mozo L, Gutiérrez C. (2005) Differential effect of IL10 and TNF- $\alpha$  genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* ;64:1605–10.
- Suárez A, López P, Mozo L, Gutiérrez C. (2005) Differential effect of IL10 and TNF{ $\alpha$ } genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. Nov;64(11):1605-10
- Szabo M, Safrany E, Pazar B, Melegh BI, Kisfali P, Poor G, Figler M, Szekanecz Z, Czirjak L, Melegh B.(2013) Marked diversity of IL23R gene haplotype variants in rheumatoid arthritis comparing with Crohn's disease and ankylosing spondylitis.*Mol Biol Rep*. Jan;40(1):359-63.
- Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. (1997) Regulation of the interleukin (IL)-12R $\beta$ 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J. Exp. Med*. 185, 817–824.
- Szabo SJ, Jacobson NG, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. (1995) Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling. *Immunity* 2, 665–675.
- Takahama Y. (2006) Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nature Reviews Immunology*. 6(2):127–135.
- Takeshita T, Asao H, Ohtani K, Ishii N, Kumaki S, Tanaka N, Munakata H, Nakamura M, Sugamura K. (1992) Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor. *Science*. 257:379–382
- Tanasescu C, Balanescu E, Balanescu P, Olteanu R, Badea C, Grancea C, Vagu C, Bleotu C, Ardeleanu C, Georgescu A. (2010) IL-17 in cutaneous lupus erythematosus. *European journal of internal medicine*, v. 21, n. 3, p. 202-7.

- Taniguchi, T., Matsui, H., Fujita, T., Takaoka, C., Kashima, N., Yoshimoto, R., Hamuro, J. (1983) Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 302: 305-310.
- Tao X, Constant S, Jorritsma P, Bottomly K. (1997) Strength of TCR Signal Determines the Costimulatory Requirements for Th1 and Th2 CD4+ T Cell Differentiation. *Journal of Immunology*. 159(12): 5956–5963.
- Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV. (1993) Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signalling by the 55-kDa TNF receptor. *JBiolChem* ;268(25):18542–18548
- Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC, et al., (1996) Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*. 382(6587):171–174,.
- Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC, et al. Requirement for Stat4 in interleukin- 12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382, 171–174 (1996).
- Tobón GJ, Correa PA, Gomez LM, Anaya JM. (2005) Lack of association between TNF- 308 polymorphism and the clinical and immunological characteristics of systemic lupus erythematosus and primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* ;23:339–44.
- Tonel G, Conrad C, Laggner U, Di Meglio P, Grys K, McClanahan TK, Blumenschein WM, Qin JZ, Xin H, Oldham E, et al. (2010) Cutting edge: a critical functional role for IL-23 in psoriasis. *J. Immun.* 185: 5688-5691.
- Trinchieri G and Sher A. (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Reviews Immunology*. 7(3):179–190.
- Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. (2003) The IL- 12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*, 19(5):641–644.
- Trinchieri, G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptative immunity. *Immunology, Dardilly*. 3:133-146.
- Tso HW, Lau YL, Tam CM, Wong HS, Chiang AK. (2004) Associations between IL12B polymorphisms and tuberculosis in the Hong Kong Chinese population. *The Journal of Infectious Diseases, Hong Kong*, p.913-919.
- Tsuda M, Kozak RW, Goldman CK, Waldmann TA. (1986) Demonstration of a non-Tac peptide that binds interleukin 2: a potential participant in a multichain interleukin 2 receptor complex *Proc Natl Acad Sci USA*, 83:9694–9698
- Tsunemi Y, Saeki H, Nakamura K, Sekiya T, Hirai K, Fujita H, Asano N, Kishimoto M, Tanida Y, Kakinuma T. (2002) Interleukin-12 p40 gene (IL12B) 3'-untranslated region polymorphism is associated with susceptibility to atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *Journal of Dermatological Science*. 161-166,.
- Tucci M, Barnes EV, Sobel ES, Croker BP, Segal MS, Reeves WH, Richards HB. Strong association of a functional polymorphism in the monocyte chemoattractant protein 1 promoter gene with lupus nephritis. *Arthritis Rheum*, v. 50, n. 6, p. 1842-9, 2004.
- Uribe AG, Vilá LM, McGwin G, Sanchez ML, Reveille JD, Alarcón GS. (2004) The Systemic Lupus Activity Measure-revised, the Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), and a modified SLEDAI-2K

- are adequate instruments to measure disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 31:1934–40.
- Van Bezooijen RL, Farih-Sips HCM, Papapoulos SE, Lowik CW. (1999) Interleukin-17: a new bone acting cytokine in vitro,” *Journal of Bone and Mineral Research*. 14(9):1513–1521.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. (2006) TGF- $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 24:179–189
- Veldhoen M, Hocking RJ, Flavell RA, Stockinger B. (2006) Signals mediated by transforming growth factor- $\beta$  initiate autoimmune encephalo- myelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat Immunol*, 7:1151–1156
- Vianna R, Simões MJ, Inforzato HCB. (2010) Lúpus eritematoso sistêmico. *Revista Ceciliansa*, Guarujá, v. 2, n. 1, p.1-3,.
- Vignali DAA, Kuchroo VK. (2012) IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature immunology*. 13(8):722-8.
- Waage A, Halstensen A, Espevik T. (1987) Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet*. 1(8529):355–357.
- Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrens TW. (2001) Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity*. 15(3):397-408.
- Walport MJ. (2000) Lupus, DNase and defective disposal of cellular debris. *Nat Genet* 25:135–136.
- Wang H, Zhong X, Wang K, Qiu W, Li J, Dai Y, Hu X.(2012) Interleukin 17 gene polymorphism is associated with anti-aquaporin 4 antibody-positive neuromyelitis optica in the Southern Han Chinese--a case control study.*J Neurol Sci*. 15;314(1-2):26-8.
- Wang JY, Shyr SD, Wang WH, Liou YH, Lin CG, Wu YJ, Wu LS. (2009) The polymorphisms of interleukin 17A (IL17A) gene and its association with pediatric asthma in Taiwanese population. *Allergy*. 64(7):1056-60.
- Wang M, Zhang Y, Han D, Zhang L (2012) Association between polymorphisms in cytokine genes IL-17A and IL-17F and development of allergic rhinitis and comorbid asthma in Chinese subjects. *Human Immunology*. 73:647-653.
- Wang XS, Wen PF, Zhang M, Hu LF, Ni J, Qiu LJ, Liang Y, Zhao W, Huang Q, Tao SS, Xu WD, Feng CC, Cen H, Leng RX, Pan HF, Ye DQ. Interleukin-7 Receptor Single Nucleotide Polymorphism rs6897932 (C/T) and the Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus. *Inflammation*. 2013 Nov 16.
- Watanabe H, Kawaguchi M, Fujishima S, Ogura M, Matsukura S, Takeuchi H, Ohba M, Sueki H, Kokubu F, Hizawa N, et al. (2009) Functional characterization of IL-17F as a selective neutrophil attractant in psoriasis. *J Invest Dermatol*.129:650–6.
- Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. (2006) Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T Cell ties. *Immunity*. 24(6):677–688.
- Wei G, Wei L, Zhu J, Zang C, Hu-Li J, Yao Z, Cui K, Kanno Y, Roh TY, Watford WT et al. (2009) Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunity*. 30:155–167

- Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. (2006) Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8<sup>+</sup> memory T cells. *Nature*. 441(7095):890–893.
- Wolf SF, Sieburth D, Sypek J. (1994) Interleukin 12: a key modulator of immune function. *Stem Cells* 12:154-168.
- Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Wong PT, Lam CW.( 2008) Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clinical immunology*. 127(3):385-93.
- Wong RH, Wei JC, Huang CH, Lee HS, Chiou SY, Lin SH, Cai YW, Hung PH, Wang MF, Yang SF.(2012) Association of IL-12B genetic polymorphism with the susceptibility and disease severity of ankylosing spondylitis.*J Rheumatol*. Jan;39(1):135-40.
- Wright JF, Guo Y, Quazi A, Luxenberg DP, Bennet F, Ross JF, Qiu Y, Whitters MJ, Tomkinson KN, Dunussi-Joannopoulos K, et al. (2007) Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4<sup>+</sup> T cells. *J Biol Chem* ;282:13447–55.
- Wu X, Zeng Z, Chen B, Yu J, Xue L, Hao Y, Chen M, Sung JJ, Hu P. (2010) Association between polymorphisms in interleukin-17A and interleukin-17F genes and risks of gastric cancer. *Int J Cancer*. 1;127(1):86-92.
- Xanthoulea S, Pasparakis M, Kousteni S, Brakebusch C, Wallach D, Bauer J, Lassmann H, Kollias G. (2004) Tumor necrosis factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infectious and inflammatory diseases. *J Exp Med*. 200(3):367-76.
- Xu M, Mizoguchi I, Morishima N, Chiba Y, Mizuguchi J, Yoshimoto T. (2010) Regulation of antitumor responses by the IL-12 Family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. *Clinical and Developmental Immunology*. 2010: 9p.
- Yan N, Yu YL, Yang J, Qin Q, Zhu YF, Wang X, Song RH, Zhang JA. (2012) Association of interleukin-17A and -17F gene single-nucleotide polymorphisms with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity*. 45(7):533-539.
- Yang W, Shen N, Ye DQ, Liu Q, Zhang Y, Qian XX, Hirankarn N, Ying D, Pan HF, Mok CC, et al. (2010) Genome-wide association study in Asian populations identifies variants in ETS1 and WDFY4 associated with systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet* 6: e1000841.
- Yang XO, Chang SH, Park H, Nurieva R, Shah B, Acero L, Wang YH, Schluns KS, Broadbush RR, Zhu Z, et al. (2008) Regulation of inflammatory responses by IL-17F. *J Exp Med*. 205:1063–75.
- Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Dong C. (2007) STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *Journal of Biological Chemistry*. 282(13):9358–9363,
- Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS et al. (2008) T Helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors RORα and RORγ. *Immunity*. 28(1):29–39.
- Yu RY, Gallagher GA. (2010) A naturally occurring, soluble antagonist of human IL-23 inhibits the development and in vitro function of human Th17 cells. *J. Immunol*. 185: 7302-7308.

- Yücel A1, Dilek K, Saba D, Özçimen AA, Yurtkuran M, Oral HB. (2013) Interleukin-2 gene polymorphism in Turkish patients with Behçet's disease and its association with ocular involvement. *Int J Immunogenet.* Oct;40(5):349-55.
- Zhang X, Yu P, Wang Y, Jiang W, Shen F, Wang Y, Tu H, Yang X, Shi R, Zhang H. (2013) Genetic polymorphisms of interleukin 17A and interleukin 17F and their association with inflammatory bowel disease in a Chinese Han population. *Inflamm Res.* 62(8):743-50
- Zheng J, Jiang L, Zhang L, Yang L, Deng J, You Y, Li N, Wu H, Li W, Lu J, Zhou Y. (2012) Functional genetic variations in the IL-23 receptor gene are associated with risk of breast, lung and nasopharyngeal cancer in Chinese populations. *Carcinogenesis.* 33(12):2409-16.
- Zhou L, Lopes JE, Chong MMW, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J, Rubtsov YP, Rudensky AY, et al. (2008) TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$  function. *Nature.* 453(7192):236–240.
- Zhou QG, Yang XB, Hou FF, Zhang X. (2009) Successful treatment of massive ascites with intraperitoneal administration of a steroid in a case of systemic lupus erythematosus. *Lupus* ;18:740–2
- Zhu J, Guo L, Watson CJ, Hu-Li J, Paul WE. (2001) Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in TH2 differentiation and cell expansion. *Journal of Immunology.* 166(12):7276–7281.
- Zhu J, Min B, Hu-Li J, Watson CJ, Grinberg A, Wang Q, Killeen N, Urban JF Jr, Guo L, Paul WE. (2004) Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in TH1-TH2 responses. *Nature Immunology.* 5(11):1157–1165.
- Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. (2006) GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Research.* 16(1):3–10.
- Zhu KJ, Zhu CY, Shi G, Fan YM. (2013) Meta-analysis of IL12B polymorphisms (rs3212227, rs6887695) with psoriasis and psoriatic arthritis. *Rheumatol Int.* Jul;33(7):1785-90.
- Ziolkowska M, Koc A, Luszczkiewicz G, Ksiezopolska-Pietrzak K, Klimczak E, Chwalinska-Sadowska H, Maslinski W. (2000). High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J. Immunol.* 164:2832–2838.
- Zúñiga J, Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, Portal-Celhay C, Yamamoto-Furusho JK, Granados J. (2001) Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Genes Immun.* 2:363–6
- Zwiers, A., Kraal, L., van de Pouw Kraan, T. C. T. M., Wurdinger, T., Bouma, G., Kraal, G. (2012) Cutting edge: a variant of the IL-23R gene associated with inflammatory bowel disease induces loss of microRNA regulation and enhanced protein production. *J. Immun.* 188: 1573-1577.

## **ANEXOS**

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da UFPE

2ª VIA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº. 011/2011 - CEP/CCS

Recife, 03 de maio de 2011

Registro do SISNEP FR – 224519

CAAE – 0290.0.172.000-08

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 299/08

**Título: "Lúpus eritematoso sistêmico e comorbidade psiquiátrica"**

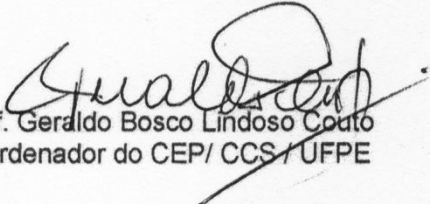
Pesquisador Responsável: Nadja Maria Jorge Asano

Senhora Pesquisadora:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 10 de dezembro de 2008.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar relatório anual da pesquisa.

Atenciosamente

  
Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto  
Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A

Doutoranda Nadja Maria Jorge Asano

Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento – CCS/UFPE

## Anexo B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: “LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E COMORBIDADE  
PSIQUIÁTRICA”

Pesquisadora Responsável: Nadja Maria Jorge Asano

Telefones: (81) 2126-3575 / (81) 87662698

Local do Estudo: Ambulatório de Reumatologia e de Psiquiatria do Hospital  
das Clínicas da UFPE

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/n Cidade Universitária  
Universidade Federal de Pernambuco - Hospital das Clínicas

1º andar - CEP 50.670-901 - Recife-PE

Prezada Senhora,

Gostaríamos de convidá-la a participar como voluntária desta pesquisa realizada no ambulatório de reumatologia e de psiquiatria do Hospital das Clínicas, através de fichas, escalas de avaliação e exames laboratoriais, para estudar a doença: LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO e as manifestações psiquiátricas relacionadas a esta doença.

As manifestações psiquiátricas podem estar presentes no Lúpus Eritematoso Sistêmico em qualquer fase da doença e necessita de acompanhamento e tratamento especializado.

Descrição do estudo : Neste estudo, nós vamos preencher uma ficha para cada paciente contendo identificação do paciente, perguntas sobre início e duração da doença, quais foram os exames que levaram ao diagnóstico, quais são as medicações usadas e se há outras doenças associadas. A paciente será agendada pela pesquisadora em dia fora da consulta programada no ambulatório de Reumatologia para participar de uma entrevista no ambulatório de Reumatologia, uma avaliação no ambulatório de Psiquiatria (neste mesmo dia) e coleta de exames de sangue e de urina. A avaliação em reumatologia durará em torno de 40 minutos e a avaliação psiquiatria durará em torno de 40 minutos.

Riscos: Os possíveis riscos que este tipo de estudo pode trazer são: constrangimento (durante as respostas das questões da entrevista) e desconforto (devido à duração das perguntas e coleta de sangue). Porém, as perguntas poderão ser interrompidas no momento em que a senhora desejar.

Benefícios: Este estudo proporcionará grandes benefícios aos seus participantes, pois através das fichas de avaliação, a paciente poderá ser beneficiada com um diagnóstico mais inicial das manifestações psiquiátricas decorrentes do Lúpus Eritematoso Sistêmico recebendo as devidas orientações e futuros encaminhamentos para a avaliação e tratamento específico no ambulatório de psiquiatria do Hospital das Clínicas caso seja necessário.

Sigilo: Esclarecemos que será garantido o sigilo do nome do participante. Apenas os pesquisadores terão acesso aos termos de consentimento e resultados. Participação Voluntária: A participação é voluntária, ou seja, a senhora não receberá nenhum tipo de pagamento para participar desta pesquisa. O dinheiro gasto com o transporte, para ir à universidade e participar dos testes, será ressarcido em espécie, imediatamente a sua despesa.

A sra. tem o direito de ser mantida atualizada sobre os resultados parciais da pesquisa, e caso seja solicitado, daremos todas as informações que solicitar.

Nós nos comprometemos a utilizar os dados coletados somente para pesquisa e os resultados serão veiculados através de artigos científicos em revistas especializadas e/ou em

encontros científicos e congressos, sem nunca tornar possível sua identificação. As fotos do procedimento serão tratadas de forma a garantir o sigilo da sua identidade, utilizando para isso uma tarja preta no rosto.

Se a senhora concordar em colaborar voluntariamente com a pesquisa e se não tiver nenhuma dúvida, gostaríamos que assinasse este termo. Mesmo assinando, a senhora poderá recusar e/ou retirar o consentimento de participar da pesquisa a qualquer momento sem prejuízo para ambas as partes.

#### PARA OBTER INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Você receberá uma cópia deste termo no qual consta o telefone da pesquisadora responsável, podendo tirar suas dúvidas a respeito do projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Pesquisadora responsável: Nadja Maria Jorge Asano (NOME COMPLETO) Telefone (81) 3441-2698/ (81) 8766-2698 (INCLUSIVE PARA LIGAÇÕES A COBRAR).

#### DECLARAÇÃO DO VOLUNTÁRIO

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito do que li ou do que foi lido para mim, descrevendo o estudo: LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E COMORBIDADE PSIQUIÁTRICA

Ficaram claros quais são os propósitos, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, benefícios e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Autorizo a utilização de minhas fotos para análise dos dados. Estou ciente de que minha identificação, que ficará reservada e caso seja necessária a divulgação da fotografia, esta apresentará uma tarja preta em meu rosto, evitando desta forma a minha identificação.

Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso aos resultados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo. Concordo voluntariamente em participar desta pesquisa e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

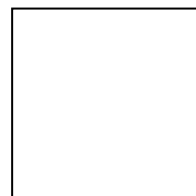
Assinaturas:

Voluntário: \_\_\_\_\_

Testemunhas: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_





## Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism –308 G/A in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus

Hildson Dornelas Angelo<sup>a,b</sup>, Helker Albuquerque da Silva<sup>b,c</sup>, Nadjia Maria Jorge Asano<sup>d</sup>,  
Maria Tereza Cartaxo Muniz<sup>e</sup>, Maria de Mascena Diniz Maia<sup>f</sup>, Paulo Roberto Eleutério de Souza<sup>f,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biological Science, Universidade de Pernambuco (ICB/UPE), Brazil

<sup>b</sup> Post-graduate program in Genetics, Universidade Federal de Pernambuco (PPGQ/UFPE), Brazil

<sup>c</sup> Department of Nutrition, Universidade de Pernambuco (UPE), Brazil

<sup>d</sup> Department of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil

<sup>e</sup> Institute of Biological Sciences, Universidade de Pernambuco (ICB/UPE), Brazil

<sup>f</sup> Department of Biology, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 January 2012

Accepted 30 July 2012

Available online xxx

### ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by the production of antibodies to components of the cell nucleus in association with a diverse array of clinical manifestations. Polymorphisms in cytokines genes may play an important role in the development and clinical manifestation. Due to this, there is a great interest in the identification of biomarkers that which could quantify the susceptibility and disease activity. A case-control study of 98 lupus cases and 76 lupus-free adults controls, was performed to analyze whether or not the polymorphism of the TNF- $\alpha$  gene promoter at positions –308 G/A would alter the risk for SLE and clinical manifestations. Genotyping was carried out by polymerase chain reaction, PCR products were digested by NcoI restriction enzyme and fractionated after on 2% Agarose gel and visualized posteriorly staining by ethidium bromide. There were significant differences in the distribution of the TNF- $\alpha$  gene polymorphism between the SLE and control groups. Individual carriers of the variant allele A had a 3.29 (95% CI: 1.7738–6.1325)-fold increased risk for SLE. Moreover, association was observed between SLE patients and serositis ( $P=0.0228$ ). This study presents a preliminary evidence of association between TNF- $\alpha$  polymorphism and SLE susceptibility in the Northeast population from Brazil.

© 2012 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic and systemic autoimmune disease with a complex pathogenesis involving multiple genetic and environmental factors. The disease is characterized by autoantibody production, abnormalities of immune-inflammatory system function and inflammatory manifestation in several organs. However, the complete etiology of SLE is still unknown [1,2]. SLE has long been appreciated to arise from both genetic and environmental factors. The contribution of these two factors may differ between individuals, but the resulting malfunctions in the immune system and the production of autoantibodies plays a pivotal role in the pathogenesis of SLE [3].

Consistent with the systemic nature of SLE, the clinical manifestations of this disease are diverse, with the skin, joints, kidneys, nervous system, serosal surfaces, and blood elements prominently

involved. These manifestations occur to a variable extent in the individual patient and their activity can change over time [4]. Currently, disease activity in SLE can be assessed using disease activity indices, such as the SLE activity index (SLEDAI), systemic lupus activity measure (SLAM), and British Isles Lupus Assessment Group (BILAG) [5].

Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) is critical in the regulation of inflammation by inducing a cascade of various inflammatory cytokines, chemokines, and other growth factors [6]. The TNF- $\alpha$  gene is located on chromosome 6p21.3, within the class III region of MHC [7]. TNF- $\alpha$  is a cytokine that plays an important role in the pathogenesis of SLE. Genetic variation in the promoter region of TNF- $\alpha$  has been associated with different phenotypic expressions, and a wide range of autoimmune diseases [8]. A change G-to-A single nucleotide polymorphism (SNP) at position –308, directly affects gene regulation and has been associated with altered transcriptional activity of TNF- $\alpha$  in various disorders [9,10]. Actually, this SNP is functionally relevant, and the TNF-308 A allele (TNF2) is related to higher transcriptional activity [11]. Because of this, the A allele has been associated with the risk of SLE [12].

\* Corresponding author. Address: Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Zip Code: 52171-900 Recife, PE, Brazil.  
E-mail address: [psouza30@gmail.com](mailto:psouza30@gmail.com) (P.R.E. de Souza).

Previous studies have been associated TNF- $\alpha$  polymorphisms and susceptibility or activity of SLE in different populations [13]. TNF2 is part of the extended haplotype HLA-A1-B8-DR3-DQ2 [14], associated with high TNF- $\alpha$  production [15,16] and with predisposition to several autoimmune diseases. Nevertheless, an increased risk of developing SLE, independent of the HLA-DR genotype, has been reported for carriers of TNF2 allele in Caucasian [17,18], African Americans [19], Chinese [20], North American white [21], Colombian [22] and Mexican [23] populations.

The understanding of the cytokine participation in SLE does not only provide a better comprehension into the pathogenesis of SLE but also sheds light on various clinical applications. Some cytokines, such Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , can serve as biomarker to monitor disease activity and predict disease severity [24,25,13]. The aim of this study was to establish the association between TNF- $\alpha$  gene polymorphism (–308 G/A) and SLE in Brazilian population and evaluate the relation among this polymorphism with the activity and the clinical manifestations of SLE.

## 2. Materials and methods

### 2.1. SLE patients and healthy controls

Blood samples were collected from 98 female SLE patients from the Rheumatology Clinic of the Hospital das Clínicas de Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco and 76 female healthy volunteers, with a mean age of  $32.06 \pm 6.8$  years and  $32.00 \pm 14.5$  years, respectively. The patients were diagnosed according to the criteria of the American College of Rheumatology. The Ethics Committee of the Health Sciences Center of Universidade Federal de Pernambuco approved the study (protocol 299/2008), and written informed consent was obtained from all subjects.

### 2.2. Disease activity

Disease activity was evaluated according to the Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (Modified SLEDAI 2k) [26] for all 98 SLE patients (Table 2). Three stages of SLE were considered as a function of the SLEDAI score: inactive SLE when SLEDAI = 0, mild/

moderate activity SLE when SLEDAI was between 1 and 7, and severe activity SLE when SLEDAI  $\geq 8$ .

### 2.3. Genotyping

Genotyping of the single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the TNF- $\alpha$  gene (–308 G/A) was carried out by polymerase chain reaction. Primer sequences (forward primer 5'-AGGCAATAGGTTTGGAGGCCAT-3'; and reverse primer: 5'-TCCTCC CTGCTCCGATTCCG-3') were used. Each PCR contained 200 ng genomic DNA in a final volume of 15.0  $\mu$ l reaction which included 1.0 pmol of each primer, 1  $\times$  GoTaq<sup>®</sup> ColorLess Master Mix (PROMEGA). PCR was performed on an automated DNA thermal cycle (Mastecycler personal, Eppendorf) with procedure as follows: initial denaturation at 94 °C for 3 min, 30 cycles of amplification consisting of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 52 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1 min and in the last cycle, extension was prolonged to 5 min [27]. The PCR products were digested using 2 unit/ $\mu$ l of NcoI restriction enzyme in a total volume of 25  $\mu$ l, containing 8  $\mu$ l of PCR product in supplied buffer. The mixture was incubated at 37 °C for 16 h. For the –308 G/A, the PCR product size was 107 bp. After digestion, the PCR product with G and A allele was digested to 3 fragments of 107, 87 and 20 bp. The PCR product with G allele was digested to 2 fragments of 87 and 20 bp. The PCR product with A allele was digested to 1 fragment of 107 bp. The digested PCR product was fractionated on 2% Agarose gel and visualized after staining by ethidium bromide.

### 2.4. Statistical analysis

The genotype distributions and allelic frequencies for the TNF- $\alpha$  gene polymorphisms for SLE patients and controls were compared using the chi-squared test. Results were considered statistically significant when the probability of findings occurring by chance was less than 5% ( $P < 0.05$ ). The odds ratios (OR) were calculated from genotypic frequency and allelic frequency with a 95% confidence interval (CI) for the TNF- $\alpha$  gene polymorphisms.

**Table 1**  
Genotypic distribution and allelic frequencies of the TNF- $\alpha$  promoter polymorphism (–308 G/A) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and controls.

| TNF- $\alpha$ Promoter | SLE patients % (n = 98) | Controls % (n = 76) | $\chi^2$ (P value)     | OR (95% CI)                   | P <sup>a</sup> |
|------------------------|-------------------------|---------------------|------------------------|-------------------------------|----------------|
| <b>Genotype</b>        |                         |                     | Reference              |                               |                |
| GG                     | 59.18 (58)              | 80.26 (61)          |                        |                               |                |
| GA                     | 28.57 (28)              | 19.73 (15)          | 3.402 (0.0651)         | 1.9632 (0.9529–4.0448)        | 0.0957         |
| AA                     | 12.24 (12)              | 0 (0)               | <b>11.512 (0.0007)</b> | –                             |                |
| GG/GA + AA             | 58/40                   | 61/15               | <b>8.798 (0.003)</b>   | <b>3.3889 (1.6767–6.8495)</b> | <b>0.0009</b>  |
| <b>Allele</b>          |                         |                     |                        |                               |                |
| G                      | 73.46 (144)             | 90.13 (137)         | <b>15.288 (0.0001)</b> | <b>3.2981 (1.7738–6.1325)</b> | <b>0.0002</b>  |
| A                      | 26.54 (52)              | 9.87 (15)           |                        |                               |                |

$\chi^2$  – Chi-square test; P value of  $\chi^2$ ; OR – odds ratio; CI – confidence interval; P<sup>a</sup> – P value of odds ratio.  
Bold characters mean significant values.

**Table 2**  
Genotypic distribution of the TNF- $\alpha$  promoter polymorphism (–308 G/A) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and severity.

| TNF- $\alpha$ Promoter | N = 98 | GG % (n = 58) | GA % (n = 28) | AA % (n = 12) | $\chi^2$ (P value) |
|------------------------|--------|---------------|---------------|---------------|--------------------|
| <b>Severity</b>        |        |               |               |               |                    |
| Inactive               | 37     | 36.20 (21)    | 46.42 (13)    | 25.00 (03)    | Reference          |
| Mild/moderate          | 25     | 24.13 (14)    | 25.00 (07)    | 33.34 (04)    | 1.060 (0.5886)     |
| Severe                 | 36     | 39.65 (23)    | 28.57 (08)    | 41.67 (05)    | 1.768 (0.4131)     |

$\chi^2$  – Chi-square test; P value of  $\chi^2$ .

Please cite this article in press as: Angelo HD et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism –308 G/A in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. Hum Immunol (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2012.07.336>

**Table 3**  
Genotypic distribution of the TNF- $\alpha$  promoter polymorphism (–308 G/A) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and clinical features

| Clinical features       |   | N = 98 | Patients  |                 | $\chi^2$ (P Value) | OR (95% CI)        | P*     |
|-------------------------|---|--------|-----------|-----------------|--------------------|--------------------|--------|
|                         |   |        | G/G % (n) | G/A + A/A % (n) |                    |                    |        |
| Malar Rash              | p | 68     | 40        | 28              | 0.012 (0.913)      | 0.95 (0.396–2.286) | ns     |
|                         | a | 30     | 18        | 12              |                    |                    |        |
| Discoid rash            | p | 37     | 26        | 11              | 3.025 (0.082)      | 0.47 (0.196–1.109) | ns     |
|                         | a | 61     | 32        | 29              |                    |                    |        |
| Photosensitivity        | p | 74     | 44        | 30              | 0.010 (0.922)      | 1.27 (0.492–3.291) | ns     |
|                         | a | 24     | 14        | 10              |                    |                    |        |
| Oral ulcers             | p | 40     | 26        | 4               | 0.946 (0.330)      | 0.66 (0.288–1.520) | ns     |
|                         | a | 58     | 26        | 26              |                    |                    |        |
| Arthritis               | p | 88     | 53        | 35              | 0.389 (0.532)      | 0.66 (0.178–2.450) | ns     |
|                         | a | 10     | 5         | 5               |                    |                    |        |
| Renal disorder          | p | 47     | 28        | 19              | 0.059 (0.807)      | 0.90 (0.404–2.026) | ns     |
|                         | a | 51     | 30        | 21              |                    |                    |        |
| Neurologic disorders    | p | 26     | 18        | 8               | 1.479 (0.224)      | 0.56 (0.214–1.442) | ns     |
|                         | a | 72     | 40        | 32              |                    |                    |        |
| Serositis               | p | 31     | 24        | 7               | 6.242 (0.012)      | 0.30 (0.114–0.791) | 0.0228 |
|                         | a | 67     | 34        | 33              |                    |                    |        |
| Hematological disorders | p | 59     | 32        | 27              | 1.502 (0.220)      | 1.69 (0.728–3.908) | ns     |
|                         | a | 39     | 26        | 13              |                    |                    |        |
| Immunologic disorders   | p | 32     | 19        | 13              | 0.001 (0.978)      | 0.99 (0.418–2.334) | ns     |
|                         | a | 66     | 39        | 27              |                    |                    |        |
| FAN                     | p | 86     | 51        | 35              | 0.004 (0.949)      | 0.96 (0.282–3.272) | ns     |
|                         | a | 12     | 7         | 5               |                    |                    |        |

p – Presence of characteristic; a – absence of characteristic;  $\chi^2$  – Chi-square test; P value of  $\chi^2$ ; OR – odds ratio of A  $\times$  G alleles; CI – confidence interval; P\* – P value of odds ratio; ns – not significant.

### 3. Results

The frequencies of the genotypes of –308 G/A of TNF- $\alpha$  in the SLE and control groups are shown in Table 1. The distribution of genotypes of TNF- $\alpha$  gene polymorphism at –308 G/A among healthy controls was in agreement with the prediction under the condition of Hardy-Weinberg equilibrium. However, the same condition was not observed in SLE group. In the SLE group, 59.18% (58/98) patients had the G/G genotype, 28.57% (28/98) patients had the G/A genotype and 12.24% (12/98) patients had the A/A genotype. In the control group, 80.16% (61/76) had the G/G TNF- $\alpha$  genotype, 19.73% (15/76) had the G/A TNF- $\alpha$  genotype and none of the controls had the A/A TNF- $\alpha$  genotype. The statistical analyses showed significant differences in the distribution of polymorphism in the promoter region of the TNF- $\alpha$  (–308 G/A) gene between the SLE and control groups (Table 1). Therefore, when the relationship between the allelic frequencies of the two groups was analyzed (Table 1), a significant association was also observed for the A allele ( $\chi^2 = 15.288$ ;  $P = 0.0001$ ; OR = 3.298).

When we analyzed the genotypic distribution among the different degrees of activity of SLE, there was no significant statistical difference (Table 2).

In addition, clinical characteristics of SLE patients were analyzed, arthritis was the most common feature, which was present in 89.97% (88/98), followed by FAN, in 87.75% (86/98), photosensitivity, in 75.51% (74/98), malar rash, in 69.38% (68/98), hematological disorders, in 60.20% (59/98), oral ulcers, in 48.97% (48/98), renal disorder, in 48.97% (48/98), discoid rash, in 37.75% (37/98), immunologic disorder, in 32.65% (32/98), serositis, in 31.63% (31/98), and neurologic disorders, in 26.53% (26/98).

Clinical features of SLE were compared between TNF-308 G/G and –308 G/A + A/A genotypes (Table 3) and except for the significant association of development of serositis ( $\chi^2 = 6.242$ ;  $P = 0.012$ ) with the presence of minor allele A, clinical manifestations were similar in both groups.

### 4. Discussion

Systemic lupus erythematosus is a multifactorial disease caused by interaction of genetic risk factors and environmental events that lead to disease initiation and progression, which can affect many organs. The levels of various cytokines have been found elevated in SLE patients; so they have been considered essential elements in the etiopathology of the disease [8]. TNF- $\alpha$  is a pro-inflammatory cytokine involved in the severity of different immune-regulated diseases including autoimmune, infectious, and malignant diseases [12].

It has been postulated that genetic polymorphisms affecting cytokine transcription exist in the regulatory regions of proinflammatory cytokine genes, and that such polymorphisms may control the level of inflammation. Several SNPs (–238, –308, –857, –863, and –1031) within the promoter region of the TNF- $\alpha$  gene have been studied and some of them are associated with altered levels of circulating TNF and could influence in susceptibility and severity of diseases, may be functional and prove useful for disease association studies [12,20,28,21,29–31]. Among them, the best-described polymorphism is located at nucleotide position –308 that modifies the consensus sequence for a binding site of the transcription factor AP-2 [8].

Several studies analyzing the polymorphism –308 G/A and SLE in different populations have found contradictory results. In Mexican [28], African Americans [21], Thai [30] and Portuguese [32] population did not show association between TNF- $\alpha$  –308 polymorphism and SLE. However, as like as our data in Colombian [22], Mexican [23], Asian [33] and Caucasian [21,34] population was found association with this SNP. Thus, it is interesting to speculate that contradictory results might be attributed to different ethnic origins.

TNF- $\alpha$  stimulates the production of inflammatory cytokines, enhances neutrophil activation and expression of adhesion molecules and acts as a costimulator for T-cell activation and antibody production. Accordingly, in vivo and in vitro studies demonstrated

Please cite this article in press as: Angelo HD et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism –308 G/A in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. Hum Immunol (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2012.07.336>

that high levels of TNF- $\alpha$  lead to exacerbation of the inflammatory response [8]. Nevertheless, data concerning the serum levels of TNF- $\alpha$  in patients with SLE are rather controversial. Ma et al. [35] observed a higher level of TNF- $\alpha$  in the plasma of patients during active disease. While other authors observed TNF-levels diminished as a function of disease activity [36–38].

Since the less common TNF2 allele was associated with high cytokine production and linked to SLE pathogenesis in different populations [23,21,33], we separated our patients into three groups: inactive, mild/moderate and severe, in order to analyze if this polymorphism could be influencing in the disease activity, but statistical analysis showed no significant differences. Probably, TNF- $\alpha$ , thought of relevance, may not provide a realistic picture of their influence on the disease activity.

Some genetic studies observed an association between specific polymorphisms and clinical features [20,30,39]. However, the associations are still unclear. In a Taiwanese cohort, malar rash, discoid rash, photosensitivity, oral ulcers, serositis, and hematological disorders were associated with the –308 G/A polymorphism [33]. While, Santos et al. [32] studying Portuguese Caucasian demonstrated a significant increase to the development of nephritis in carrying A allele patients. In the present study, was observed relationship with serositis. Serositis refers to inflammation of the serous tissues of the body, the tissues lining the lungs (pleura), heart (pericardium), and the inner lining of the abdomen (peritoneum) and organs within. Serositis is a common finding among the wide range of manifestations of SLE patients. The prognosis of lupus serositis is generally good, but in some cases, it can be life-threatening. Approximately 16% of SLE patients have pleuritis and/or pericarditis, but the effusion rarely causes ventilator or circulatory repercussion. However, peritoneal serositis with ascites (known as lupus peritonitis) is an extremely rare manifestation [40,41].

In contrast, other studies did not find the relationship between TNF- $\alpha$  gene polymorphism (–308 G/A) in SLE patients and development of clinical manifestations of SLE [21,29,30,42]. These controversial results could be due to the genetic heterogeneity of SLE in different ethnicities.

Our findings suggest that the TNF- $\alpha$  –308 polymorphism may play an important role in the susceptibility and pathogenesis of SLE in the Brazilian population.

#### Acknowledgments

We thank the patients and their families, whose collaboration and understanding have made this work possible. This study was supported by the Brazilian funding agencies FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

#### References

- [1] Ardoín SP, Pisetsky DS. Developments in the scientific understanding of lupus. *Arthritis Res Ther* 2008;10:216–8.
- [2] Sánchez E, Sabio JM, Callejas JL, de Ramón E, García-Portales R, García-Hernández FJ, et al. Association study of genetic variants of pro-inflammatory chemokine and cytokine genes in systemic lupus erythematosus. *BMC Med Genet* 2006;7:48.
- [3] Sestak AL, Nath SK, Sawalha AH, Harley JB. Current status of lupus genetics. *Arthritis Res Ther* 2007;9:210–9.
- [4] Mina R, Brunner HL. Pediatric lupus – are there differences in presentation, genetics, response to therapy, and damage accrual compared with adult lupus? *Rheum Dis Clin North Am* 2010;36:53–80.
- [5] Hay EM, Bacon PA, Gordon C, Isenberg DA, Maddison P, Snaith ML, et al. The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *Q J Med* 1993;86:447–58.
- [6] Wouters EF, Reynaert NL, Dentener MA, Vernooy JH. Systemic and local inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: is there a connection? *Proc Am Thorac Soc* 2009;6:638–47.
- [7] Constantin PK, Wawrzynowicz-Syczewska M, Clare M, Boron-Kaczmarek A, McFarlane IG, Cramp ME, et al. Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy. *Liver* 2002;22:404–12.
- [8] López P, Gutiérrez C, Suárez A. IL-10 and TNF $\alpha$  genotypes in SLE. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:838390.
- [9] Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3195–9.
- [10] Wu WS, McClain KL. DNA polymorphisms and mutations of the tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) promoter in Langerhans cell histiocytosis (LCH). *J Interferon Cytokine Res* 1997;17:631–5.
- [11] Karimi M, Goldie LC, Cruickshank MN, Moses EK, Abraham LJ. A critical assessment of the factors affecting reporter gene assays for promoter SNP function: a reassessment of –308 TNF polymorphism function using a novel integrated reporter system. *Eur J Hum Genet* 2009;17:1454–62.
- [12] Lee YH, Harley JB, Nath SK. Meta-analysis of TNF- $\alpha$  promoter –308 A/G polymorphism and SLE susceptibility. *Eur J Hum Genet* 2006;14:364–71.
- [13] Yap DY, Lai KN. Cytokines and their roles in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: from basics to recent advances. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:365083.
- [14] Price P, Witt C, Alcock R, Sayer D, Garlepp M, Kok CC, et al. The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunol Rev* 1999;167:257–74.
- [15] Jacob CO, Fronck Z, Lewis GD, Koo M, Hansen JA, McDevitt HO. Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumour necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1233–7.
- [16] Abraham LJ, French MA, Dawkins RL. Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumour necrosis factor- $\alpha$ . *Clin Exp Immunol* 1993;92:14–8.
- [17] D'Alfonso S, Colombo G, Della Bella S, Scorza R, Momigliano-Richiardi P. Association between polymorphisms in the TNF region and systemic lupus erythematosus in the Italian population. *Tissue Antigens* 1996;47:551–5.
- [18] Tsuchiya N, Kawasaki A, Tsao BP, Komata T, Grossman JM, Tokunaga K. Analysis of the association of HLA-DRB1, TNF- $\alpha$  promoter and TNFR2 (TNFRSF1B) polymorphisms with SLE using transmission disequilibrium test. *Genes Immun* 2001;2:317–22.
- [19] Sullivan KE, Wooten C, Schmeckpeper BJ, Goldman D, Petri MA. A promoter polymorphism of tumour necrosis factor alpha associated with systemic lupus erythematosus in African-Americans. *Arthritis Rheum* 1997;40:2207–11.
- [20] Azizah MR, Kuak SH, Ainol SS, Rahim MN, Normaznah Y, Norella K. Association of the tumour necrosis factor alpha gene polymorphism with susceptibility and clinical-immunological findings of systemic lupus erythematosus. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2004;22:159–63.
- [21] Parks CG, Pandey JP, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS, et al. Genetic polymorphisms in tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and TNF- $\beta$  in a population-based study of systemic lupus erythematosus: associations and interaction with the interleukin-1 $\alpha$ -889 C/T polymorphism. *Hum Immunol* 2004;65:622–31.
- [22] Guarnizo-Zuccardi P, Lopez Y, Giraldo M, García N, Rodríguez L, Ramírez L, et al. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2007;70:376–82.
- [23] Jiménez-Morales S, Velázquez-Cruz R, Ramírez-Bello J, Bonilla-González E, Romero-Hidalgo S, Escamilla-Guerrero G, et al. Tumour necrosis factor- $\alpha$  is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population. *Hum Immunol* 2009;70:251–6.
- [24] Studnicka-Benke A, Steiner G, Petera P, Smolen JS. Tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors parallel clinical disease and autoimmune activity in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 1996;35:1067–74.
- [25] Sabry A, Sheashaa H, El-Husseini A, Mahmoud K, Eldahshan KF, George SK, et al. Proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) in Egyptian patients with SLE: its correlation with disease activity. *Cytokine* 2006;35:148–53.
- [26] Uribe AG, Vilá LM, McGwin G, Sanchez ML, Reveille JD, Alarcón GS. The Systemic Lupus Activity Measure-revised, the Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), and a modified SLEDAI-2K are adequate instruments to measure disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2004;31:1934–40.
- [27] Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, et al. Polymorphism in tumour necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1995;182:1259–64.
- [28] Zúñiga J, Vargas-Alarcón G, Hernández-Pacheco G, Portal-Celhay C, Yamamoto-Furusho JK, Granados J. Tumour necrosis factor- $\alpha$  promoter polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Genes Immun* 2001;2:363–6.
- [29] Tobón CJ, Correa PA, Gomez LM, Anaya JM. Lack of association between TNF-308 polymorphism and the clinical and immunological characteristics of systemic lupus erythematosus and primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:339–44.
- [30] Hirankarn N, Avihingsanon Y, Wongpiyabovorn J. Genetic susceptibility to SLE is associated with TNF- $\alpha$  gene polymorphism –863, but not –308 and –238, in Thai population. *Int J Immunogenet* 2007;34:425–30.
- [31] Asghar T, Yoshida S, Kennedy S, Negoro K, Zhou W, Hamana S, et al. The tumour necrosis factor- $\alpha$  promoter –1031C polymorphism is associated with decreased risk of endometriosis in a Japanese population. *Hum Reprod* 2004;19:2509–14.

Please cite this article in press as: Angelo HD et al. Tumour necrosis factor alpha promoter polymorphism –308 G/A in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2012.07.336>

- [32] Santos MJ, Carmona-Fernandes D, Caetano-Lopes J, Perpétuo IP, Vidal B, Capela S, et al. TNF promoter -308 G>A and LTA 252 A>G polymorphisms in Portuguese patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s00296-011-1950-1> [Online First, 5 May 2011].
- [33] Lin YJ, Chen RH, Wan L, Sheu JC, Huang CM, Lin CW, et al. Association of TNF-alpha gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Taiwanese patients. *Lupus* 2009;18:974–9.
- [34] van der Linden MW, van der Slik AR, Zanelli E, Giphart MJ, Pieterman E, Schreuder GM, et al. Six microsatellite markers on the short arm of chromosome 6 in relation to HLA-DR3 and TNF-308A in systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 2001;2:373–80.
- [35] Ma CY, Jiao YL, Zhang J, Yang QR, Zhang ZF, Shen YJ, et al. Elevated plasma level of HMGB1 is associated with disease activity and combined alterations with IFN-alpha and TNF-alpha in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 2010;32(2):395–412.
- [36] Jacob CO. Tumor necrosis factor alpha in autoimmunity: pretty girl or old witch? *Immunol Today* 1992;13:122–5.
- [37] Jones BM, Liu T, Wong RW. Reduced in vitro production of interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-12 and increased production of interleukin-6, interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha in systemic lupus erythematosus. Weak correlations of cytokine production with disease activity. *Autoimmunity* 1999;31:117–24.
- [38] Mageed RA, Isenberg DA. Tumour necrosis factor alpha in systemic lupus erythematosus and anti-DNA autoantibody production. *Lupus* 2002;11:850–5.
- [39] Hajeer AH, Worthington J, Davies EJ, Hillarby MC, Poulton K, Ollier WE. TNF microsatellite a2, b3 and d2 alleles are associated with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 1997;49:222–7.
- [40] Man BL, Mok CC. Serositis related to systemic lupus erythematosus: prevalence and outcome. *Lupus* 2005;14:822–6.
- [41] Zhou QG, Yang XB, Hou FF, Zhang X. Successful treatment of massive ascites with intraperitoneal administration of a steroid in a case of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009;18:740–2.
- [42] Suárez A, López P, Mozo L, Gutiérrez C. Differential effect of IL10 and TNF-α genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1605–10.

4-3106-9

## Interferon gamma and Interleukin 10 polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus

Hildson Dornelas Angelo da Silva · Alex Paulino da Silva ·  
Helker Albuquerque da Silva · Nadjia Maria Jorge Asano ·  
Maria de Mascena Diniz Maia · Paulo Roberto Eleutério de Souza

Received: 10 January 2013 / Accepted: 6 January 2014  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

**Abstract** The pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) is complex, with several susceptibility genes and environmental factors involved in its development and clinical manifestation. Currently, there is a great amount of interest in the identification of biomarkers, as cytokines, that can quantify the susceptibility of SLE, the risk of future organ involvement, and association of their changes with disease activity. To investigate the associations between polymorphisms in the gene of Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) and in the promoter of the Interleukin-10 (IL-10) gene and SLE. The polymorphisms +874 T/A (rs2430561) in the IFN- $\gamma$  gene and -1082G/A (rs1800896) in the IL-10

promoter were determined in 99 SLE patients and 100 healthy controls among women Brazilian using the refractory mutation system polymerase chain reaction method. Disease activity was assessed using the SLE activity index. There were significant differences in the distribution of the genotype T/A in IFN- $\gamma$  gene polymorphism (+874) ( $\chi^2 = 7.168$ ;  $P = 0.0074$ ) and the genotype G/A in IL-10 promoter polymorphism (-1082) ( $\chi^2 = 4.654$ ;  $P = 0.0310$ ) between the SLE and control groups. However, no association was observed between clinical features and the polymorphisms studied. This study presents preliminary evidence for association between IL-10 and IFN- $\gamma$  polymorphism and SLE susceptibility, but not with clinical features in a Northeast population from Brazil.

**Keywords** Systemic lupus erythematosus · Cytokines · IFN- $\gamma$  · IL-10 · Polymorphisms

H. D. A. da Silva  
Campus Garanhuns of Federal Institute of Pernambuco (Campus Garanhuns/IFPE), Garanhuns, Brazil

H. D. A. da Silva · H. A. da Silva  
Universidade Federal de Pernambuco (PPGG/UFPE), Teresina, Brazil

A. P. da Silva  
Laboratory of Biochemical Genetics and DNA Sequencing  
Professora Tânia Falcão, Universidade Federal Rural de Pernambuco (Genoma/UFRPE), Recife, Brazil

H. A. da Silva  
Departament of Nutrition, Universidade de Pernambuco (UPE), Santo Amaro, Brazil

N. M. J. Asano  
Departament of Clinical Medicine, Faculty of Medicine,  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE),  
Cidade Universitari, Brazil

M. M. D. Maia · P. R. E. de Souza (✉)  
Departament of Biology, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife 52171-900, PE, Brazil  
e-mail: prsouza30@gmail.com

### Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease characterized by several organ damage, high titers of autoantibodies, and various clinical manifestations [1]. The pathogenesis of SLE is multifactorial, with multiple susceptibility genes and environmental factors involved in its development [2, 3]. Consistent with the systemic nature of SLE, the clinical manifestations of this disease are diverse, with the skin, joints, kidneys, nervous system, serosal surfaces, and blood elements prominently involved. These manifestations occur to a variable extent in the individual patient and their activity can change over time [4]. Thus, there is a great deal of interest in the identification of biomarkers that are responsible for the onset and progression of the disease.

Published online: 18 January 2014

 Springer

In several cytokine genes, as IL6 [5], IL8 [6], IL10 [7], TNF- $\alpha$  [8], IFN- $\gamma$  [9], polymorphisms located within promoter regions, mostly single nucleotide polymorphisms (SNP), or microsatellites, have been described which affect gene transcription, causing a high variations in cytokine production and thus have been shown to be involved in the susceptibility, severity and clinical features of SLE [5–9].

Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) is a cytokine which has been implicated in the protection against intracellular organisms and the development of autoimmune disease. IFN- $\gamma$  is a key cytokine that controls Th1-dependent immune responses. Concentrations of IFN- $\gamma$  are increased in SLE patients, and the production of IFN- $\gamma$  by PBMCs from SLE patients is significantly correlated with global disease activity [10, 11]. A single-nucleotide polymorphism, T to A, at position +874 in the first intron has been shown previously associated with the IFN- $\gamma$  production level [12]. However, IFN- $\gamma$  gene (+874 T/A) SNPs which is related to the high, intermediate and low responder phenotype has shown variable effects in different populations [13]. This SNP has been associated with susceptibility and progression to a variety of illness because the AA genotype (homozygous mutant) is responsible for low levels of this cytokine expression, since the DNA sequence containing the T allele is the specific binding site for NF- $\kappa$ B transcription factor, which transcribes the gene for interleukin production [12]. Furthermore, previous studies suggest that IFN- $\gamma$  could influence in susceptibility and activity of SLE [9, 14].

Interleukin 10 (IL-10) is a pleiotropic cytokine with strong immunosuppressive properties and plays a critical role in regulating the immune response, mainly through inhibition of pro-inflammatory mediators. This protein is mainly produced by activated T cells, activated monocytes/macrophages, stimulated B cells, and mast cells [15]. A number of polymorphisms of the IL-10 gene promoter have been described. These include the SNP at positions –1082 (G to A substitution). Briefly, IL-10 –1082 A→G is localized in the proximal region of the IL-10 promoter between –4 kb and –1.1 kb. The –1082 genotypes GG, GA and AA, corresponding to the phenotypes high, intermediate and low producer of IL-10, independent of the nucleotide variations present at positions –819 and –592 gene IL10 [16]. Several evidences suggest that IL-10 could be a strong candidate gene influencing SLE susceptibility [7, 17, 18].

However, few previous studies have explored the relation between polymorphisms in cytokines genes and the presence of SLE among Brazilian patients. Wherefore, the aim of the present study was to investigate the association of the IFN- $\gamma$  +874 T/A and IL-10 –1082 G/A polymorphisms with SLE susceptibility and disease features in Brazilian patients.

## Materials and methods

### SLE patients and healthy controls

A total of 99 women Brazilian patients with SLE and 100 women healthy controls from the Rheumatology Clinic of the Hospital das Clínicas de Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco, with a mean age of  $30.05 \pm 6.8$  years and  $32.00 \pm 14.5$  years, respectively, were studied. The patients were diagnosed according to the criteria of the American College of Rheumatology. The clinical and laboratory characteristics were obtained by consulting the patient's medical files. These included malar rash, discoid rash, photosensitivity, oral ulcers, arthritis, serositis, FAN and neurological, hematological, immunologic, renal disorders. The Ethics Committee of the Health Sciences Center of Universidade Federal de Pernambuco approved the study (protocol 299/2008), and written informed consent was obtained from all subjects.

### Disease activity

Disease activity was evaluated according to the SLE disease activity index (modified SLEDAI 2k) [19] for all 99 SLE patients. Three stages of SLE were considered as a function of the SLEDAI score: inactive SLE when SLEDAI = 0, mild/moderate activity SLE when SLEDAI was between 1 and 7, and severe activity SLE when SLEDAI  $\geq 8$ .

### Genotyping

Genotyping of the single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the IL-10 gene (–1082 G/A) and polymorphisms in the gene region of the IFN- $\gamma$  (+874 T/A) was carried out by Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction (ARMS-PCR). Each PCR contained 100 ng genomic DNA in a final volume of 15.0  $\mu$ l reaction which included 1.0 pmol of each primer, 1 $\times$  Gotaq<sup>®</sup> ColorLess Master Mix (PROMEGA).

### IFN- $\gamma$

The primer sequences ("T" forward primer 5'-TTCTTAC AACACAAAATCA-AATCT-3'; "A" forward primer 5'-TTCTTACAACACAAAATCAAATCA-3'; and reverse primer 5'-TCAACAAAGCTGATACTCCA-3'). ARMS-PCR was performed on an automated DNA thermal cycle (Mastercycler personal, Eppendorf) following the method described by Pravica and col. [20]. The PCR products of 261 bp were identified by gel electrophoresis on 2 % agarose gels stained with ethidium bromide.

**Table 1** Genotypic distribution and allelic frequencies of the IFN- $\gamma$  gene polymorphism (+874 T/A) and of the IL-10 promoter polymorphism (-1082 G/A) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and controls

| IFN- $\gamma$ | SLE patients % (n = 99) | Controls % (n = 76)  | P value                     | OR (95 % CI)                   | P*            |
|---------------|-------------------------|----------------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------|
| Genotype      |                         |                      |                             |                                |               |
| TT            | 3.03 (3)                | 17.10 (13)           | Reference                   |                                |               |
| TA            | 88.87 (88)              | 60.53 (46)           | <b>0.0006<sup>a</sup></b>   | <b>8.2899 (2.2478–30.5726)</b> | <b>0.0008</b> |
| AA            | 8.08 (8)                | 22.37 (17)           | 0.4783 <sup>a</sup>         | 2.0392 (0.4502–9.2375)         | 0.5668        |
| Allele        |                         |                      |                             |                                |               |
| T             | 47.47 (94)              | 47.37 (72)           | 0.000 (0.9842) <sup>b</sup> | 0.9957 (0.6521–1.5205)         | 0.9297        |
| A             | 52.53 (104)             | 52.63 (80)           |                             |                                |               |
| IL-10         | SLE patients % (n = 90) | Controls % (n = 100) | P value                     | OR (95 % CI)                   | P*            |
| G/G           | 1.12 (1)                | 8.0 (8)              | Reference                   |                                |               |
| G/A           | 90.0 (81)               | 72.0 (72)            | <b>0.0172<sup>a</sup></b>   | <b>9.000 (1.0988–73.715)</b>   | <b>0.0361</b> |
| A/A           | 8.88 (8)                | 20.0 (20)            | 0.4030 <sup>a</sup>         | 3.200 (0.3425–29.904)          | 0.5382        |
| Allele        |                         |                      |                             |                                |               |
| G             | 46.12 (83)              | 44.0 (88)            | 0.171 (0.6796) <sup>b</sup> | 0.9182 (0.6126–1.3764)         | 0.7567        |
| A             | 53.88 (97)              | 56.0 (112)           |                             |                                |               |

Bold characters mean significant values

OR odds ratio, CI confidence interval, P\* P value of OR

<sup>a</sup> P value of Fisher's exact test

<sup>b</sup> P value of  $\chi^2$

## IL-10

IL-10 promoter polymorphism at position -1082 was analyzed by the ARMS-PCR. Briefly, a 258 bp fragment containing the polymorphism was amplified in a machines DNA thermal cycle (Mastercycler personal, Eppendorf) using specific primers ("A" forward primer 5'-ACT-CTAAGGCTTCTTTGGGAA-3'; "G" forward primer 5'-CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG-3' and reverse primer 5'-CAGTGCCAACTGAGAATTTGG-3') and the conditions were based on Crilly and col. [21]. The PCR products were identified by gel electrophoresis on 2 % agarose gels stained with ethidium bromide.

## Statistical analysis

The genotype distributions and allelic frequencies for the IL-10 and IFN- $\gamma$  gene polymorphisms for SLE patients and controls were compared using the Chi squared test. Fisher's exact test was used instead when the expected frequency is less than 5. A probability value (p value) less than 0.05 was considered statistically significant. The odds ratios (OR) were calculated from genotypic frequency and allelic frequency with a 95 % confidence interval (CI) for the IL-10 and IFN- $\gamma$  gene polymorphisms.

## Results

In the present study, the polymorphisms of the IFN- $\gamma$  gene at position +874 T/A and of the IL-10 gene promoter at position -1082 G/A in patients with SLE were investigated and compared with those in healthy subjects. ARMS-PCR method was used to determine these polymorphisms in the IFN- $\gamma$  gene and in the promoter region of the IL-10 gene (Table 1). The control group was sex- and age-matched to the patient group. Table 1 summarizes the genotype distribution and allele frequencies of IFN- $\gamma$  gene polymorphisms in healthy controls and patients with SLE. Of the 99 SLE patients, DNA of 99 and 90 patients were successfully genotyped for SNPs of T→A at position +874 and G→A at -1082 gene region of the IFN- $\gamma$  and promoter region of the IL-10 gene, respectively.

Evaluation of genotype distributions at +874 position showed significant difference between SLE patients and controls. The frequency of T/A genotype was significantly higher in the SLE group, conferring a risk factor to development of SLE. We also analyzed the relationship between the two groups in allelic frequencies of IFN- $\gamma$  (Table 1). There was no significant association in frequency between SLE patients and normal subjects. There was significant difference in the genotype of the IL-10 promoter -1082 G/A polymorphism between SLE and

**Table 1** Genotypic distribution and allelic frequencies of the IFN- $\gamma$  gene polymorphism (+874 T/A) and of the IL-10 promoter polymorphism (-1082 G/A) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and controls

| IFN- $\gamma$ | SLE patients % (n = 99) | Controls % (n = 76)  | P value                     | OR (95 % CI)                   | P*            |
|---------------|-------------------------|----------------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------|
| Genotype      |                         |                      |                             |                                |               |
| TT            | 3.03 (3)                | 17.10 (13)           | Reference                   |                                |               |
| TA            | 88.87 (88)              | 60.53 (46)           | <b>0.0006<sup>a</sup></b>   | <b>8.2899 (2.2478–30.5726)</b> | <b>0.0008</b> |
| AA            | 8.08 (8)                | 22.37 (17)           | 0.4783 <sup>a</sup>         | 2.0392 (0.4502–9.2375)         | 0.5668        |
| Allele        |                         |                      |                             |                                |               |
| T             | 47.47 (94)              | 47.37 (72)           | 0.000 (0.9842) <sup>b</sup> | 0.9957 (0.6521–1.5205)         | 0.9297        |
| A             | 52.53 (104)             | 52.63 (80)           |                             |                                |               |
| IL-10         | SLE patients % (n = 90) | Controls % (n = 100) | P value                     | OR (95 % CI)                   | P*            |
| G/G           | 1.12 (1)                | 8.0 (8)              | Reference                   |                                |               |
| G/A           | 90.0 (81)               | 72.0 (72)            | <b>0.0172<sup>a</sup></b>   | <b>9.000 (1.0988–73.715)</b>   | <b>0.0361</b> |
| A/A           | 8.88 (8)                | 20.0 (20)            | 0.4030 <sup>a</sup>         | 3.200 (0.3425–29.904)          | 0.5382        |
| Allele        |                         |                      |                             |                                |               |
| G             | 46.12 (83)              | 44.0 (88)            | 0.171 (0.6796) <sup>b</sup> | 0.9182 (0.6126–1.3764)         | 0.7567        |
| A             | 53.88 (97)              | 56.0 (112)           |                             |                                |               |

Bold characters mean significant values

OR odds ratio, CI confidence interval, P\* P value of OR

<sup>a</sup> P value of Fisher's exact test

<sup>b</sup> P value of  $\chi^2$

## IL-10

IL-10 promoter polymorphism at position -1082 was analyzed by the ARMS-PCR. Briefly, a 258 bp fragment containing the polymorphism was amplified in a machines DNA thermal cycle (Mastercycler personal, Eppendorf) using specific primers ("A" forward primer 5'-ACT-CTAAGGCTTCTTTGGGAA-3'; "G" forward primer 5'-CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG-3' and reverse primer 5'-CAGTGCCAACTGAGAATTTGG-3') and the conditions were based on Crilly and col. [21]. The PCR products were identified by gel electrophoresis on 2 % agarose gels stained with ethidium bromide.

## Statistical analysis

The genotype distributions and allelic frequencies for the IL-10 and IFN- $\gamma$  gene polymorphisms for SLE patients and controls were compared using the Chi squared test. Fisher's exact test was used instead when the expected frequency is less than 5. A probability value (p value) less than 0.05 was considered statistically significant. The odds ratios (OR) were calculated from genotypic frequency and allelic frequency with a 95 % confidence interval (CI) for the IL-10 and IFN- $\gamma$  gene polymorphisms.

## Results

In the present study, the polymorphisms of the IFN- $\gamma$  gene at position +874 T/A and of the IL-10 gene promoter at position -1082 G/A in patients with SLE were investigated and compared with those in healthy subjects. ARMS-PCR method was used to determine these polymorphisms in the IFN- $\gamma$  gene and in the promoter region of the IL-10 gene (Table 1). The control group was sex- and age-matched to the patient group. Table 1 summarizes the genotype distribution and allele frequencies of IFN- $\gamma$  gene polymorphisms in healthy controls and patients with SLE. Of the 99 SLE patients, DNA of 99 and 90 patients were successfully genotyped for SNPs of T→A at position +874 and G→A at -1082 gene region of the IFN- $\gamma$  and promoter region of the IL-10 gene, respectively.

Evaluation of genotype distributions at +874 position showed significant difference between SLE patients and controls. The frequency of T/A genotype was significantly higher in the SLE group, conferring a risk factor to development of SLE. We also analyzed the relationship between the two groups in allelic frequencies of IFN- $\gamma$  (Table 1). There was no significant association in frequency between SLE patients and normal subjects. There was significant difference in the genotype of the IL-10 promoter -1082 G/A polymorphism between SLE and

bution and allelic frequencies of the IFN- $\gamma$  gene polymorphism (+874 T/A) and of the IL-10 promoter polymorphism (-1082 G/A) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and controls

| IFN- $\gamma$ gene | N = 99 | T/T % (n = 2) | T/A % (n = 88) | A/A % (n = 8) | P value   |
|--------------------|--------|---------------|----------------|---------------|-----------|
| Activity           |        |               |                |               |           |
| Inactive           | 38     | 50.0 (1)      | 37.50 (33)     | 50.0 (4)      | Reference |
| Mild/Moderate      | 24     | 50.0 (1)      | 25.0 (22)      | 12.50 (1)     | 0.8264    |
| Severe             | 36     | 0 (0)         | 37.50 (33)     | 37.50 (3)     | 1         |
| IL-10 Promoter     | N = 90 | G/G % (n = 1) | G/A % (n = 81) | A/A % (n = 8) | P value   |
| Inactive           | 34     | 100.0 (1)     | 37.04 (30)     | 37.50 (3)     | Reference |
| Mild/Moderate      | 23     | 0 (0)         | 23.45 (19)     | 50.0 (4)      | 0.6592    |
| Severe             | 33     | 0 (0)         | 39.51 (32)     | 12.50 (1)     | 0.4827    |

P value of Fisher's exact test

**Table 3** Genotypic distribution of the IFN- $\gamma$  gene polymorphism (+874 T/A) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and clinical features

| Clinical features       |   | N = 99 | Patients     |         | $\chi^2$ (P value) | OR (95 % CI)        | P* |
|-------------------------|---|--------|--------------|---------|--------------------|---------------------|----|
|                         |   |        | T/T + TA (n) | A/A (n) |                    |                     |    |
| Malar rash              | p | 69     | 62           | 7       | 0.4289             | 0.30 (0.359–2.599)  | ns |
|                         | a | 30     | 29           | 1       |                    |                     |    |
| Discoid rash            | p | 38     | 35           | 3       | 1                  | 1.041 (234–4.633)   | ns |
|                         | a | 61     | 56           | 5       |                    |                     |    |
| Photosensitivity        | p | 75     | 67           | 8       | 0.01931            | nd                  | ns |
|                         | a | 24     | 24           | 0       |                    |                     |    |
| Oral ulcers             | p | 41     | 37           | 4       | 0.7147             | 0.688 (0.161–2.914) | ns |
|                         | a | 58     | 54           | 4       |                    |                     |    |
| Arthritis               | p | 88     | 82           | 6       | 0.2167             | 2.989 (0.259–0.39)  | ns |
|                         | a | 11     | 9            | 2       |                    |                     |    |
| Renal disorder          | p | 47     | 44           | 3       | 0.7179             | 1.553 (0.283–10.59) | ns |
|                         | a | 52     | 47           | 5       |                    |                     |    |
| Neurologic disorders    | p | 26     | 23           | 3       | 0.4294             | 0.567 (0.111–3.937) | ns |
|                         | a | 73     | 68           | 5       |                    |                     |    |
| Serositis               | p | 32     | 29           | 3       | 0.7109             | 0.781 (0.140–5.374) | ns |
|                         | a | 67     | 62           | 5       |                    |                     |    |
| Hematological disorders | p | 60     | 56           | 4       | 0.7085             | 1.592 (0.278–9.138) | ns |
|                         | a | 39     | 35           | 4       |                    |                     |    |
| Immunologic disorders   | p | 34     | 32           | 2       | 0.7113             | 1.620 (0.269–17.32) | ns |
|                         | a | 65     | 59           | 6       |                    |                     |    |
| FAN                     | p | 87     | 79           | 8       | 0.5904             | nd                  | ns |
|                         | a | 12     | 12           | 0       |                    |                     |    |

p Presence of characteristic, a absence of characteristic, P value of Fisher's exact test; OR odds ratio, CI confidence interval, P\* P value of odds ratio, ns not significant, nd not defined

control groups. The -1082 G/A genotypes were associated with a significantly increased risk of SLE as compared with the -1082 G/G genotypes (OR 9.0; 95 % CI 1.09–73.71;  $P = 0.019$ ). However the allele frequencies did not showed significant difference.

When we analyzed the genotypic distribution among the different degrees of activity of SLE, there was no significant statistical difference (Table 2).

In addition, clinical characteristics of SLE patients were analyzed, being Arthritis the feature most common,

**Table 4** Genotypic distribution of the IL10 gene polymorphism (−1082 G/A) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and clinical features

| Clinical features       |   | N = 90 | Patients      |         | P value | OR (95 % CI)        | P* |
|-------------------------|---|--------|---------------|---------|---------|---------------------|----|
|                         |   |        | G/G + G/A (n) | A/A (n) |         |                     |    |
| Malar rash              | p | 61     | 58            | 3       | 0.1056  | 3.957 (0.706–27.49) | ns |
|                         | a | 29     | 24            | 5       |         |                     |    |
| Discoid rash            | p | 35     | 32            | 3       | 1       | 1.066 (0.192–7.337) | ns |
|                         | a | 55     | 50            | 5       |         |                     |    |
| Photosensitivity        | p | 66     | 61            | 5       | 0.4364  | 1.731 (0.248–9.809) | ns |
|                         | a | 24     | 21            | 3       |         |                     |    |
| Oral ulcers             | p | 36     | 34            | 2       | 0.4684  | 2.109 (0.350–22.59) | ns |
|                         | a | 54     | 48            | 6       |         |                     |    |
| Arthritis               | p | 80     | 73            | 7       | 1       | 1.157 (0.023–10.93) | ns |
|                         | a | 10     | 9             | 1       |         |                     |    |
| Renal disorder          | p | 43     | 39            | 4       | 1       | 0.908 (0.158–5.227) | ns |
|                         | a | 47     | 43            | 4       |         |                     |    |
| Neurologic disorders    | p | 24     | 20            | 4       | 0.202   | 0.327 (0.055–1.927) | ns |
|                         | a | 66     | 62            | 4       |         |                     |    |
| Serositis               | p | 27     | 26            | 1       | 0.4271  | 3.217 (0.381–151.9) | ns |
|                         | a | 63     | 56            | 7       |         |                     |    |
| Hematological disorders | p | 53     | 48            | 5       | 1       | 0.849 (0.123–4.704) | ns |
|                         | a | 37     | 34            | 3       |         |                     |    |
| Immunologic disorders   | p | 30     | 28            | 2       | 0.7139  | 1.548 (0.255–16.66) | ns |
|                         | a | 60     | 54            | 6       |         |                     |    |
| FAN                     | p | 81     | 74            | 7       | 0.5851  | 1.317 (0.026–12.74) | ns |
|                         | a | 9      | 8             | 1       |         |                     |    |

p Presence of characteristic, a absence of characteristic, P value of Fisher's exact test, OR odds ratio, CI confidence interval, P\* P value of odds ratio, ns not significant

followed by FAN, in 87.88 %, Photosensitivity, in 75.76 %, Malar Rash, in 69.70 %, Hematological disorders, in 60.61 %, Renal disorder, in 47.48 %, Oral ulcers, in 41.42 %, Discoid rash, in 38.39 %, Immunologic disorders, in 34.35 %, Serositis, in 32.33 % and Neurologic disorders, in 26.27 %. Clinical features of SLE were compared between IFN- $\gamma$  +874 T/T +T/A versus A/A genotypes (Table 3) and IL-10 −1082 G/G + G/A versus A/A genotypes (Table 4) and with except of an borderline effect ( $\chi^2 = 3.686$ ;  $P = 0.054$ ) between SLE and Malar rash to IL-10 polymorphism, clinical manifestations were similar in both groups.

## Discussion

We have previously demonstrated that the TNF- $\alpha$  -308 (G/A) markedly elevated the risk to SLE susceptibility and that when samples were stratified according to clinical manifestations, the A allele (mutant) seems to be a factor contributor to development of serositis in a Brazilian population [8]. In this study, we identified relationships

between polymorphisms of IFN- $\gamma$ , and IL-10 genes and SLE susceptibility, but not in relation with clinical features of SLE in Brazilian population again.

IFN- $\gamma$  is an important cytokine produced in response to inflammatory stimuli to regulate the human immune response. IFN- $\gamma$  levels are high levels in patients with SLE than healthy individuals, especially in period active disease [22–24]. It has been postulated that genetic polymorphisms affecting cytokine transcription exist in the regulatory regions of proinflammatory cytokine genes, and that such polymorphisms may control the level of inflammation. It was believed that the over-production of IFN- $\gamma$  in SLE patients led to the pathogenesis of the disease [23]. Few number of studies were development to analyze the relationship between the +874 T/A SNP in the IFN- $\gamma$  gene and SLE, to our knowledge until now, this work is a pioneer in the study of this SNP in patients with SLE in the Brazilian population.

Our results did show a difference significant between polymorphism in IFN- $\gamma$  gene in SLE patients and controls in our population (Table 1). The gene expression products from the A allele may affect the susceptibility of an

individual to SLE. However, we did not observe any significant association of the homozygous AA genotype with the onset of SLE or with protection from developing SLE. On the other hand, individuals with the heterozygous TA genotype were observed to be predisposed to SLE development. Thus, it is suggested that the T allele has a masking effect over the A allele in the heterozygous TA genotype, causing an increased production of IFN gamma and thus leading to the development of SLE.

Until the last revision done, few articles related the +874 SNP with susceptibility to SLE. Kim et al. [9] studying Korean population found the relation of three SNPs and SLE susceptibility. Among them, the polymorphism +874 T/A IFN- $\gamma$  (OR 2.48;  $p = 0.022$ ). However, none difference significant was found analyzing the clinical features. Contrary, Tangwattanaachuleeporn et al. [14] when studied SLE patients and matched healthy control from Thailand did not observe a positive association between the +874 T/A polymorphism in the first intron of the IFN- $\gamma$  gene and susceptibility to SLE. Nevertheless, the A allele was associated with the development of arthritis in SLE patients. IFN- $\gamma$  has been related with several other diseases, as Leprosy [25], coronary artery disease [26] and Leishmaniasis [27].

IL-10 is a pleiotropic anti-inflammatory cytokine, and as an immunosuppressor cytokine, is the main inhibitor of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) [28]. The IL10 polymorphism at position -1082 is located within the binding site of transcriptional factor and may alter level of IL-10 cytokine production and secretion. The A allele at position -1082 of IL10 has been associated with lower production of this cytokine, while the G allele has been associated with higher level of this cytokine [29].

In the present study we demonstrated that Brazilian SLE patients had a higher frequency of the GA genotype at IL-10 promoter (-1082) than the healthy controls (OR 9.000;  $P = 0.0361$ ). There might be a close relationship between Brazilian SLE patients and IL-10 promoter 1082 polymorphism, suggesting the role of IL-10 in the pathogenesis of SLE in Brazilian. Since -1082A is associated with low IL-10 production [16], carrier of A allele (GA and AA) should have a decreasing in a production of IL-10, an important anti-inflammatory cytokine, contributing to a higher risk of developing SLE. However, the results found by Khoa [7] showed significant skewing in the frequency of the three genotypes between the two groups ( $\chi^2 = 6.64$ ;  $P < 0.05$ ). Especially the homozygous G/G ( $\chi^2 = 5.87$ ;  $P < 0.05$ ). SLE patients had a significantly higher frequency of the G allele compared with control subjects ( $\chi^2 = 5.85$ ;  $P < 0.05$ ). On the other hand, Guarnizo-Zucardi et al. [30] did not observe a significant difference in IL-10 -1082 genotype and allele frequencies between control subjects and SLE patients in the Colombian

population. Studies conducted in Spanish and Caucasian population did not confirm any significant association of SLE with different haplotypes or genotypes of IL-10 promoter [31, 32]. A genetic association between these three SNPs in the IL-10 promoter region and SLE has been reported in Spanish populations, showing that -819 and -592 polymorphisms were associated with age at onset of disease [18].

Furthermore, were analyzed the correlations between polymorphisms and clinical features of patients with SLE, being observed none statistical difference (Table 3). The same outcome was found by other studies [7, 18, 30, 32]. However, Discoid rash, in a Spanish, Neurologic disorders, in a Dutch and Renal disorder in a Chinese populations were found by Suárez [31], Rood [33] and Mok [34], respectively. These controversial results about clinical features could be due to the genetic heterogeneity of SLE in different ethnicities, genotypic distribution and allelic frequencies between different populations. Finally, there were no significant differences in between the SNPs studied and degree of activity.

To our knowledge, the present findings are novel in demonstrating an association between IFN- $\gamma$  and IL-10 with SLE. Nevertheless, when interpreting the results of this study, we should keep in mind the possible limitations in statistical validity of studies with small sample size, and also, the necessity for further studies with a larger number of samples and a more robust statistical analyzes in order to prove the findings of this article in the population studied.

In the present work, genotypic and allelic distributions of IL-10 promoter region (-1082 G/A) and IFN- $\gamma$  gene region (+874 T/A) polymorphisms showed significant difference between SLE patients and controls. This finding is explained either by that fact this polymorphism plays role in genic expression resulting in different level of IL-10 and IFN- $\gamma$  plasma and could influencing directly in SLE susceptibility.

**Acknowledgments** We thank the patients and their families, whose collaboration and understanding have made this work possible. This study was supported by FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

## References

1. Kotzin BL (1996) Systemic lupus erythematosus. *Cell* 85:303–306. doi:10.1016/0092-8674(00)81108-3
2. Mok CC, Lau CS (2003) Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 56:481–490. doi:10.1136/jcp.56.7.481
3. Tsao BP (2004) Update on human systemic lupus erythematosus genetics. *Curr Opin Rheumatol* 16:513–521
4. Mina R, Brunner HI (2010) Pediatric lupus: are there differences in presentation, genetics, response to therapy, and damage accrual

- compared with adult lupus? *Rheum Dis Clin North Am* 36:53–80. doi:10.1016/j.rdc.2009.12.012
5. Chua KH, Kee BP, Tan SY, Lian LH (2009) Interleukin-6 promoter polymorphisms (–174 G/C) in Malaysian patients with systemic lupus erythematosus. *Braz J Med Biol Res* 42:551–555. doi:10.1590/S0100-879X2009000600012
6. Huang CM, Hao AP, Tsai CH, Chen CL, Tsai FJ (2006) Lack of association of interleukin-6 and interleukin-8 gene polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Lab Anal* 20:255–259. doi:10.1002/jcla.20151
7. Khoa PD, Sugiyama T, Yokochi T (2005) Polymorphism of interleukin-10 promoter and tumor necrosis factor receptor II in Vietnamese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 24:11–13. doi:10.1007/s10067-004-0952-1
8. Angelo HD, da Silva HA, Asano NM, Muniz MT, de Mascena Diniz Maia M, de Souza PR PR (2012) Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism –308 G/A in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 73(11):1166–1170. doi:10.1016/j.humimm.2012.07.336
9. Kim K, Cho SK, Sestak A, Namjou B, Kang C, Bae SC (2010) Interferon-gamma gene polymorphisms associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 69:1247–1250. doi:10.1136/ard.2009.117572
10. Akahoshi M, Nakashima H, Tanaka Y, Kohsaka T, Nagano S, Ohgami E, Arinobu Y, Yamaoka K, Niho H, Shinozaki M, Hirakata H, Horiuchi T, Otsuka T, Niho Y (1999) Th1/Th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 42:1644–1648. doi:10.1002/1529-0131(199908)42:8<1644::AID-ANR12>3.0.CO;2-L
11. Viillard JF, Pellegrin JL, Ranchin V, Schaevebeke T, Dehais J, Longy-Boursier M, Ragnaud JM, Leng B, Moreau JF (1999) Th1 (IL-2, interferon-gamma (IFN-gamma)) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 115:189–195. doi:10.1046/j.1365-2249.1999.00766.x
12. Izad M, Vojdani M, Nicknam MH, Lotfi J, Fathi D, Amirzargar AA (2004) Interferon-gamma gene polymorphism in Iranian patients with multiple sclerosis. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 3:115–119. doi:10.03/ijaa.115119
13. Pacheco AG, Cardoso CC, Moraes MO (2008) IFNG +874T/A, IL10 –1082G/A and TNF –308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. *Hum Genet* 123:477–484. doi:10.1007/s00439-008-0497-5
14. Tangwattanasuchaleeporn M, Sodsai P, Avihingsanon Y, Wongpiyabovorn J, Wongchinsri J, Hirankarn N (2007) Association of interferon-gamma gene polymorphism (+874A) with arthritis manifestation in SLE. *Clin Rheumatol* 26:1921–1924. doi:10.1007/s10067-007-0699-6
15. Opal SM, DePalo VA (2000) Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117:1162–1172. doi:10.1378/chest.117.4.1162
16. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Verweij CL, Sturk A (1997) Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet* 349:1912–1913. doi:10.1016/S0140-6736(96)06413-6
17. Nath SK, Harley JB, Lee YH (2005) Polymorphisms of complement receptor 1 and interleukin-10 genes and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Hum Genet* 118:225–234. doi:10.1007/s00439-005-0044-6
18. Rosado S, Rua-Figueroa I, Vargas JA, Garcia-Laorden MI, Losada-Fernandez I, Martin-Donaire T, Perez-Chacon G, Rodriguez-Gallego C, Naranjo-Hernandez A, Ojeda-Bruno S, Citores MJ, Perez-Aciego P (2008) Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus from the Canary Islands. *Int J Immunogenet* 35:235–242. doi:10.1111/j.1744-313X.2008.00762.x
19. Uribe AG, Vilá LM, McGwin G, Sanchez ML, Reveille JD, Alarcón GS (2004) The Systemic Lupus Activity Measure-revised, the Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), and a modified SLEDAI-2K are adequate instruments to measure disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 31:1934–1940. doi:10.3151/2X-31-1934
20. Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV (2000) A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. *Hum Immunol* 61:863–866. doi:10.1016/S0198-8859(00)00167-1
21. Crilly A, Hamilton J, Clark CJ, Jardine A, Madhok R (2003) Analysis of the 5' flanking region of the interleukin 10 gene in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology* 42:1295–1298. doi:10.1093/rheumatology/keg420
22. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, Pascual V (2003) Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 197:711–723. doi:10.1084/jem.20021553
23. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, Shark KB, Grande WJ, Hughes KM, Kapur V, Gregersen PK, Behrens TW (2003) Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2610–2615. doi:10.1073/pnas.0337679100
24. Kirou KA, Lee C, George S, Louka K, Papagiannis IG, Peterson MG, Ly N, Woodward RN, Fry KE, Lau AY, Prentice JG, Wohlgemuth JG, Crow MK (2004) Coordinate overexpression of interferon-alpha-induced genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 50:3958–3967. doi:10.1002/art.20798
25. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Dias-Baptista IM, Maniero VC, Venturini J, Vilani-Moreno FR, de Souza FC, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Pacheco AG, Moraes MO (2010) IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum Genet* 128:481–490. doi:10.1007/s00439-010-0872-x
26. Kim HJ, Kang SW, Chung JH, Kim SJ, Choe BK (2011) Polymorphisms of the Interferon gamma gene and coronary artery disease in the Korean population. *Mol Biol Rep*. doi:10.1007/s11033-011-1342-9
27. Matos GI, CeJ Covas, ReC Bittar, Gomes-Silva A, Marques F, Maniero VC, Amato VS, Oliveira-Neto MP, MaS Mattos, Pirmez C, Sampaio EP, Moraes MO, Da-Cruz AM (2007) IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN-gamma production. *BMC Infect Dis* 7:33. doi:10.1186/1471-2334-7-33
28. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147:3815–3822
29. Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Khan TA, Moore KW (1992) Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol* 148:3618–3623
30. Guarnizo-Zaccardi P, Lopez Y, Giraldo M, Garcia N, Rodriguez L, Ramirez L, Uribe O, Garcia L, Vasquez G (2007) Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 70:376–382. doi:10.1111/j.1399-0039.2007.00917.x
31. Suárez A, López P, Mozo L, Gutiérrez C (2005) Differential effect of IL10 and TNF-α genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 64:1605–1610. doi:10.1136/ard.2004.035048
32. Dijkstra-Hoem HM, Hepkema BG, Kallenberg CG, van der Linden MW, Keijsers V, Huizinga TW, Jansen MD, van de Winkel JG

- (2002) The R-H polymorphism of FCgamma receptor IIa as a risk factor for systemic lupus erythematosus is independent of single-nucleotide polymorphisms in the interleukin-10 gene promoter. *Arthritis Rheum* 46:1125–1126. doi:10.1002/art.518
33. Rood MJ, Keijsers V, van der Linden MW, Tong TQ, Borggreve SE, Verweij CL, Breedveld FC, Huizinga TW (1999) Neuro-psychiatric systemic lupus erythematosus is associated with imbalance in interleukin 10 promoter haplotypes. *Ann Rheum Dis* 58:85–89. doi:10.1136/ard.58.2.85
34. Mok CC, Lanchbury JS, Chan DW, Lau CS (1998) Interleukin-10 promoter polymorphisms in Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41:1090–1095. doi:10.1002/1529-0131(199806)41:6<1090



Rapid Communication

# Interleukin-6 promoter polymorphisms –174 G/C in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus



Nadja Maria Asano<sup>a</sup>, Hildson Dornelas Angelo<sup>b,c</sup>, Helker Albuquerque da Silva<sup>c,d</sup>, Maria Mascena Maia<sup>e</sup>, Otavio Gomes Lins<sup>f</sup>, Paulo Eleutério Souza<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil

<sup>b</sup> Federal Institute of Paraíba – Campus Patos (IFPB – Patos), Brazil

<sup>c</sup> Post-Graduate Program in Genetics, Universidade Federal de Pernambuco (PPGG/UFPE), Brazil

<sup>d</sup> Department of Nutrition, Universidade de Pernambuco (UPE), Brazil

<sup>e</sup> Department of Biology, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Brazil

<sup>f</sup> Department of Neuropsychiatry, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 13 December 2012

Accepted 29 May 2013

Available online 12 June 2013

## ABSTRACT

To investigate the association of the IL-6 gene promoter polymorphism (–174 G/C) with SLE susceptibility and disease features in Brazilian patients, a case-control study of 80 lupus cases and 60 volunteer healthy women was performed. Genotyping was carried out by polymerase chain reaction and PCR product was digested by Hsp92II restriction enzyme, being after visualized in polyacrylamide gel. There were significant differences in the distribution of the IL-6 gene C/C polymorphism between the SLE and control groups ( $\chi^2 = 8.668$ ;  $P = 0.0032$ ). Individual carriers of the variant allele G had a 1.98 (95% CI: 1.084–3.6353)-fold increased risk for SLE. Besides, association was observed in frequency of C allele ( $P = 0.0247$ ; OR = 0.5036) between SLE patients and control groups. This study presents preliminary evidence for association between IL-6 polymorphism and SLE susceptibility in a Northeast population from Brazil.

© 2013 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease that affects multiple tissues and systems and is characterized by significant variability in clinical manifestations and organ involvement [1], primarily affecting young women and with variable frequency in racial and ethnic groups. Studies have suggested that the etiology of SLE has genetic and environmental components [2]. The clinical manifestations of this disease are diverse and occur to a variable extent in the individual patient and their activity can change over time [3–5]. Currently, disease activity can be assessed using SLE disease activity index (SLEDAI) [6].

Cytokines are known to be involved in the immunopathology of SLE. It has been shown that alternation in cytokine production and cytokine networks contribute to tolerance defects and impaired cellular immunity in SLE. Interleukin-6 (IL-6) is a multifunctional cytokine regulating humoral and cellular responses and playing a central role in inflammation and tissue injury. The IL-6 gene has been mapped to the short arm of chromosome 7 (21p15p) organized into five exons and four introns [7,8].

Many polymorphisms in the promoter region of IL-6 gene have been described [9–12], among them, the single nucleotide change from G to C at position –174 (rs1800795) that affects IL-6 levels [9] and has been associated with numerous diseases, including systemic onset juvenile arthritis [13], Sjögren's syndrome [14], Alzheimer disease [15], type II diabetes mellitus [16], cardiovascular disease [17] and SLE [18,19]. The aim of this study was to find out whether single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the IL-6 gene (–174 G>C) constitute a genetic susceptibility for SLE and its association with various disease clinical and immunological features.

## 2. Materials and methods

### 2.1. SLE patients and healthy controls

A total of 140 individuals were included in the study, 80 patients with SLE, fulfilling the 1982 revised criteria of the American Rheumatism Association for the classification of SLE, with a mean age of  $32.06 \pm 6.8$  years, all were females. They were enrolled from Rheumatology Clinic of the Hospital das Clínicas de Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco. The control group included 60 age- and sex-matched unrelated healthy volunteers from Foun-

\* Corresponding author. Address: Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brazil.

E-mail address: prsouza30@gmail.com (P.E. Souza).

dation of Hematology and Hemotherapy of Pernambuco (Hemope Foundation – Pernambuco – Brazil), without no family history of autoimmune disease with a mean age of  $32.00 \pm 14.5$  years. Both patients and controls groups belong to the same ethnic background and share a common geographical origin, constituted of about 85% of African and 15% of European-derived. The Ethics Committee of the Health Sciences Center of Universidade Federal de Pernambuco approved the study, and written informed consent was obtained from all subjects.

## 2.2. Genotyping

For the determination of the IL-6 polymorphism were used primer sequences (forward primer 5'-TTGTCAAGACATGCCAAAGTG-3'; and reverse primer: 5'-CTGATTGGA-AACCTTATTAGG-3') following the technique of RFLP-PCR. A final volume of 15.0  $\mu$ l reaction was performed on an automated DNA thermal cycle (Mastercycler personal, Eppendorf) as described previously [20]. The PCR products were digested using HSP92II restriction enzyme in a total volume of 25  $\mu$ l. After digestion, the PCR product with G and C allele was digested in 4 fragments of 244, 133, 111 and 56 bp. The PCR product with G allele was digested in 2 fragments of 244 and 56 bp. The PCR product with C allele was digested in fragment of 133, 111 and 54 bp. The digested PCR product was fractionated on 12% polyacrylamide gel and visualized after staining by ethidium bromide.

## 2.3. Statistical analysis

Differences in the frequencies of the IL-6 allele in the study and control groups were analyzed by  $\chi^2$ -test. The odds ratios (OR) was used as a measure of the strength of the association between allele frequencies and SLE. All *P*-values were two-tailed and 95% CI were calculated. Results were considered statistically significant when the probability of findings occurring by chance was less than 5% ( $P < 0.05$ ).

## 3. Results

The frequencies of the genotypes of IL-6 in the SLE and healthy control groups are shown in Table 1. The distribution of genotypes of IL-6 gene polymorphism at -174 G>C among patients and healthy controls was in agreement with the prediction under the condition of Hardy–Weinberg equilibrium. The statistical analysis showed significant differences in the distribution of the IL-6 gene C/C polymorphism between the SLE patients and healthy control groups ( $\chi^2 = 8.668$ ;  $P = 0.0032$ ). Moreover, when the relationship between the two groups in allelic frequencies was analyzed also had significant association in relation of C allele ( $P = 0.0247$ ; OR = 0.5036) between SLE patients and healthy control groups.

In Table 2 the distribution of genotypic and allelic frequencies among different populations were analyzed. Comparing Brazilian

**Table 2**  
IL-6 promoter polymorphism –174 G/C: genotype distribution and allele frequency in Brazilian patients, Iranian controls and Portuguese Caucasian controls.

|                      | GG % (n)   | GC % (n)  | CC % (n)  | $\chi^2$            | <i>P</i>            |
|----------------------|------------|-----------|-----------|---------------------|---------------------|
| SLE                  | 71.2 (57)  | 28.7 (23) | 0 (0)     | 8.672 <sup>a</sup>  | 0.0131 <sup>a</sup> |
| Iranian              | 67.1 (224) | 29.6 (99) | 33.6 (51) | 2.819 <sup>b</sup>  | 0.2443 <sup>b</sup> |
| Portuguese Caucasian | 33.6 (51)  | 54.6 (83) | 11.8 (18) | 33.143 <sup>c</sup> | 0.0001 <sup>c</sup> |

<sup>a</sup> SLE Brazilian patients vs Brazilian controls.

<sup>b</sup> SLE Brazilian patients vs Iranian controls (data are from Godarzi et al., 2011).

<sup>c</sup> SLE Brazilian patients vs Portuguese Caucasian controls (data are from Santos et al., 2011).

SLE patients and Portuguese healthy controls there was significant statistical difference ( $P = 0.0001$ ).

To verify if there is association of clinical features of SLE with polymorphism in the promoter region of IL-6 gene, we compared the high-producer genotype (G/G) versus low-producers genotypes (G/C + C/C) (Table 3). No significant association among them was found. However, an effect of borderline ( $\chi^2 = 3.587$ ;  $P = 0.0582$ ) between SLE and Arthritis was observed.

## 4. Discussion

It has been postulated that genetic polymorphisms affecting cytokine transcription exist in the regulatory regions of proinflammatory cytokine genes, and that such polymorphisms may control the level of inflammation.

It was believed that the over-production of IL-6 in SLE patients led to the pathogenesis of the disease [21]. Thus, we performed our case-control study in Brazilian SLE patients, hypothesizing that this genetic polymorphism may contribute to the susceptibility to SLE or its diverse clinical immunological manifestation.

In the present study we found the genotype C/C and C allele more frequently in the healthy controls than in patients, observing a significant statistical difference ( $P = 0.0032$  and  $P = 0.0247$ , respectively). Similar outcomes were observed by Chua et al. [18] and Hamdy et al. [19], in Malaysian and Egyptian populations, respectively. Furthermore, in our SLE patients, carriers of the variant allele G had a 1.98 fold increased risk for SLE, indicating the protect effector of C allele. It is important to note that Fishman et al. [13] found that the G/G homozygotes had circulating IL-6 concentrations approximately twice higher than homozygous for the C allele studying systemic-onset juvenile chronic arthritis in Caucasian population. Due to this, it is interesting to speculate the increased prevalence of the high-response allele, -174 G, it suggests that a genetically determined high IL-6 response may have a pathogenic role in SLE [18,19]. On the other hand, some studies did not find association [9,10–12,23]. Contradictory results might be attributed to different ethnic origins.

**Table 1**  
Genotypic distribution and allelic frequencies of the IL-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and controls.

| IL-6 promoter | SLE patients % (n = 80) | Controls % (n = 60) | $\chi^2$ (P value)    | OR (95% CI)            | <i>P</i> |
|---------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|----------|
| Genotype      |                         |                     |                       |                        |          |
| GG            | 71.25 (57)              | 60.0 (36)           | Reference             |                        | 0.7087   |
| GC            | 28.75 (23)              | 30.0 (18)           | 0.319 (0.5723)        | 0.8070 (0.3832–1.6994) |          |
| CC            | 0 (0)                   | 10.0 (6)            | <b>8.668 (0.0032)</b> | –                      |          |
| Allele        |                         |                     |                       |                        |          |
| G             | 85.62 (137)             | 75.0 (90)           | <b>5.044 (0.0247)</b> | 1.9855 (1.0844–3.6353) | 0.0365   |
| C             | 14.38 (23)              | 25.0 (30)           |                       | 0.5036 (0.2751–0.9221) |          |

$\chi^2$  – Chi-square test; *P* value of  $\chi^2$ ; OR – odds ratio; CI – confidence interval; *P* – *P* value of OR; Bold characters mean significant values.

on of the IL-6 promoter polymorphism (–174 G/C) in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and clinical features.

|                            | Total, n = 80 | SLE patients with G/G genotype, n = 57 | SLE patients with (G/C and C/C) genotypes, n = 23 | $\chi^2$ (P value)    | OR (95% CI)         |
|----------------------------|---------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| Malar rash, %              | 66.25         | 61.4                                   | 31.5                                              | 2.083 (0.1490)        | 0.312 (0.174–1.426) |
| Discoid rash, %            | 37.5          | 36.7                                   | 39.1                                              | 0.037 (0.8483)        | 0.372 (0.372–2.283) |
| Photosensitivity, %        | 75.0          | 71.9                                   | 82.6                                              | 0.997 (0.3181)        | 1.853 (0.188–1.853) |
| Oral ulcers, %             | 43.75         | 38.6                                   | 56.5                                              | 2.140 (0.1435)        | 0.548 (0.224–1.336) |
| Arthritis, %               | 90.0          | 85.9                                   | 100                                               | <b>3.587 (0.0582)</b> | –                   |
| Serositis, %               | 28.75         | 29.8                                   | 26.1                                              | 0.112 (0.7382)        | 1.168 (0.429–3.179) |
| Renal disorder, %          | 48.75         | 49.1                                   | 47.8                                              | 0.011 (0.9164)        | 3.179 (0.431–2.527) |
| Hematological disorders, % | 58.75         | 57.8                                   | 60.8                                              | 0.060 (0.8067)        | 2.527 (0.365–2.227) |
| Auto-antibodies, %         | 90.0          | 91.2                                   | 86.9                                              | 0.332 (0.5643)        | 2.227 (0.374–5.471) |
| Neurologic disorders       |               |                                        |                                                   |                       |                     |
| Convulsion, %              | 28.75         | 24.5                                   | 39.4                                              | 1.698 (0.1925)        | 5.471 (0.229–1.441) |
| Mood disorder, %           | 51.25         | 47.3                                   | 60.8                                              | 1.196 (0.2742)        | 0.633 (0.257–1.561) |
| Anxiety disorder, %        | 56.25         | 54.3                                   | 60.8                                              | 0.280 (0.5967)        | 0.800 (0.324–1.975) |
| Suicide risk, %            | 35.0          | 31.5                                   | 43.4                                              | 1.020 (0.3125)        | 0.657 (0.267–1.612) |

$\chi^2$  – Chi-square test; P value of  $\chi^2$ ; OR – odds ratio; CI – confidence interval; Bold characters mean significant values.

The small number of samples of healthy controls could be a limitation of this study, wherefore, our patients were compared with two HC populations, Portuguese and Iranian, one similar to ours and the other more genetically different, respectively. However, only a significant difference between SLE patient and Portuguese controls was observed. This observation may confirm that the number of control group could not be mentioned as a determinant limitation of this study.

In addition, clinical and experimental data suggest the IL-6 locus as candidate gene for SLE, promoting many immunopathological features, such as polyclonal B-cell hyperactivity and the production of autoantibodies, could be detected in compartments involved in active disease [22]. In the present study, the correlation between polymorphism and clinical feature of SLE was investigated, but did not show any significant statistical difference (Table 3). However, was observed a borderline effect between the polymorphism –174 G/C in the IL-6 gene and the development of arthritis ( $\chi^2 = 3.587$ ;  $P = 0.0582$ ). Thus, we believe that the increase of the study population may confirm a possible association, once other studies has been supported this association in some autoimmune diseases, such as Juvenile Chronic Arthritis [13], Rheumatoid Arthritis [24] and SLE [19].

Although, the associations between clinical features and SLE are still unclear, some studies verified association to Arthritis and Nephritis in an Egyptian [19], Discoid rash and FAN in the German Caucasian [23] and Nephritis in the Portuguese population [11]. Nevertheless, other studies did not find any significant statistical difference in the development of clinical characteristic in SLE patients [9,18,23]. These controversial results, once again, may be due to the genetic heterogeneity of SLE in different ethnicities and/or genotypic distribution and allelic frequencies between different populations.

In conclusion, we found that IL-6 gene promoter polymorphism (–174 G/C) may significantly contribute to SLE susceptibility, but not to the development of clinical features of SLE in Brazilian patients.

#### Acknowledgments

We thank the patients and their families, whose collaboration and understanding have made this work possible. This study was supported by FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

#### References

- [1] La Cava A. Anticytokine therapies in systemic lupus erythematosus. *Immunotherapy* 2010;2:575.
- [2] Ardoin SP, Pisetsky DS. Developments in the scientific understanding of lupus. *Arthritis Res Ther* 2008;10:218.
- [3] Mina R, Brunner HL. Pediatric lupus – are there differences in presentation, genetics, response to therapy, and damage accrual compared with adult lupus? *Rheum Dis Clin North Am* 2010;36:53.
- [4] Illei GG, Tackey E, Lapteva L, Lipsky PE. Biomarkers in systemic lupus erythematosus. I. General overview of biomarkers and their applicability. *Arthritis Rheum* 2004;50:1709.
- [5] Illei GG, Tackey E, Lapteva L, Lipsky PE. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: II. Markers of disease activity. *Arthritis Rheum* 2004;52:2048.
- [6] Hay EM, Bacon PA, Gordon C, Isenberg DA, Maddison P, Snaith ML, et al. The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *Q J Med* 1993;86:447.
- [7] Chen WF, Fischer M, Frank G, Zlotnik A. Distinct patterns of lymphokine requirement for the proliferation of various subpopulations of activated thymocytes in a single cell assay. *J Immunol* 1989;143:1598.
- [8] May LT, Santhanam U, Tatter SB, Bhardwaj N, Ghayeb J, Sehgal PB. Phosphorylation of secreted forms of human beta 2-interferon/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;152:1144.
- [9] Godarzi EM, Sarvestani EK, Afkari E, Amirghofran Z. Interleukin-6 gene polymorphism in Iranian patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2011;30:179.
- [10] Huang CM, Huo AP, Tsai CH, Chen CL, Tsai FJ. Lack of association of interleukin-6 and interleukin-8 gene polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Lab Anal* 2006;20:255.
- [11] Santos MJ, Fernandes D, Capela S, da Silva JC, Fonseca JE. Interleukin-6 promoter polymorphism –174 G/C is associated with nephritis in Portuguese Caucasian systemic lupus erythematosus patients. *Clin Rheumatol* 2011;30:409.
- [12] Abbas D, Hamdy E, Helal MM. Promoter region polymorphism (–174 G/C) of interleukin-6 gene and SLE: are they associated? *Egypt Rheumatol* 2011;33:69.
- [13] Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102:1369.
- [14] Hukkinen J, Pertovaara M, Anttonen J, Pasternack A, Hurme M. Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL6 gene in primary Sjögren's syndrome and correlate with the clinical manifestations of the disease. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:656.
- [15] Papassotiropoulos A, Hock C, Nitsch RM. Genetics of interleukin 6: implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2001;22:863.
- [16] Libra M, Signorelli SS, Bevilacqua Y, Navolanic PM, Bevilacqua V, Polesel J, et al. Analysis of G(–174)C IL-6 polymorphism and plasma concentrations of inflammatory markers in patients with type 2 diabetes and peripheral arterial disease. *J Clin Pathol* 2006;59:211.
- [17] Georges JL, Loukaci V, Poirier O, Evans A, Luc G, Arveiler D, et al. Interleukin-6 gene polymorphisms and susceptibility to myocardial infarction: the ECTIM study. *Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde*. *J Mol Med (Berl)* 2001;79–300.
- [18] Chua KH, Kee BP, Tan SY, Lian LH. Interleukin-6 promoter polymorphisms (–174 G/C) in Malaysian patients with systemic lupus erythematosus. *Braz J Med Biol Res* 2009;42:551.

- [19] Hamdy E, Afify RAA, Kamal A, Abass D, Mahmoud M. IL-6 promoter polymorphism (–174G/C) and systemic lupus erythematosus. *Comp Clin Pathol* 2011;1:1.
- [20] Unfried G, Böckör S, Endler G, Nagele F, Huber JC, Tempfer CB. A polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and idiopathic recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 2003;18:267.
- [21] Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T, Klinenberg JR. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. *J Immunol* 1991;147:117.
- [22] Schotte H, Schlüter B, Rust S, Assmann G, Domschke W, Gaubitz M. Interleukin-6 promoter polymorphism (–174 G/C) in Caucasian German patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2001;40:393.
- [23] Belluco C, Olivieri F, Bonafè M, Giovagnetti S, Marmmano E, Scalera R, et al. –174 G>C polymorphism of interleukin 6 gene promoter affects interleukin 6 serum level in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:2173.
- [24] Panoulas V, Stavropoulos-Kalinoglou A, Metsios G, Smith P, Millonis H, Karen MJ. Association of interleukin-6 (IL-6) –174G/C gene polymorphism with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: the role of obesity and smoking. *Atherosclerosis* 2009;204(1):178.

## 10. Curriculum vitae (Lattes)

**Helker Albuquerque Macedo da Silva**

Curriculum Vitae

---

### Dados pessoais

**Nome** Helker Albuquerque Macedo da Silva

**Endereço residencial** Rua Quatro  
Jatobá - Petrolina  
56300-000, PE - Brasil  
Telefone: 87 88032770

**Endereço profissional** Universidade de Pernambuco, Colegiado de Nutrição  
BR 203, Km 2, s/n  
Vila Eduardo - Petrolina  
56328-903, PE - Brasil  
Telefone: 87 38666468

**Endereço eletrônico**  
E-mail para contato : helker\_albuquerque@hotmail.com  
e-mail alternativo : helker\_albuquerque@yahoo.com.br

---

### Formação acadêmica/titulação

**2010** Doutorado em Genética.  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil  
Título: Associação de polimorfismos de base única em genes de interleucinas genéticos no Lúpus Eritematoso  
Orientador: Maria Tereza Cartaxo Muniz  
Co-orientador: Paulo Roberto Eleutério de Souza

**2008 - 2010** Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada.  
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil  
Título: Relação dos polimorfismos dos genes APOE, MTHFR, MS, concentração de Hcy e Cys e o déficit cognitivo na população idosa do Distrito de Fernando de Noronha /PE, Ano de obtenção: 2010  
Orientador: Maria Tereza Cartaxo Muniz  
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

**2004 - 2008** Graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas.  
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil  
Título: Polimorfismo de APOE-e4 e déficit cognitivo na população idosa de Fernando de Noronha  
Orientador: Maria Tereza Cartaxo Muniz

---

### Formação complementar

**2008 - 2008** Curso de curta duração em MicroRNAs aplic. ao estudo de proce. biolog comple.  
Sociedade Brasileira de Genética, SBG, Ribeirao Preto, Brasil

**2006 - 2007** Extensão universitária em Aula de Música - Castelinho (voluntário).

Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil

- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. Conselho Regional de Biologia 5ª Região, CRBIO 5, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Técnicas Histológicas e estudo dos tecidos fundame. Conselho Regional de Biologia 5ª Região, CRBIO 5, Brasil

---

## Atuação profissional

### 1. Universidade de Pernambuco - UPE

---

#### Vínculo institucional

- 2010 - Atual** Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Professor Assistente , Carga horária: 40, Regime: Integral
- 2006 - 2010** Vínculo: Estudante/Pesquisador , Enquadramento funcional: Estudante/Pesquisador , Carga horária: 30, Regime: Parcial

---

#### Atividades

- 02/2010 - 02/2010** Pós-graduação, Especialização em Biologia Molecular  
*Disciplinas ministradas:*  
*Técnicas em Biologia Molecular*
- 05/2009 - 05/2009** Graduação, Bacharelado em Enfermagem  
*Disciplinas ministradas:*  
*Genética*
- 08/2008 - 10/2008** Graduação, Medicina  
*Disciplinas ministradas:*  
*Bioquímica , Genética , Biologia Celular*
- 08/2008 - 11/2008** Estágio, Instituto de Ciências Biológicas  
*Estágio:*  
*Estágio Docência*
- 09/2007 - 09/2007** Especialização  
*Especificação:*  
*Colaboração nas aulas práticas da disciplina de Técnicas em Biologia Molecular*
- 07/2007 - 07/2007** Especialização  
*Especificação:*  
*Colaboração nas aulas prática da disciplina Técnicas em Biologia Molecular*
- 08/2006 - 08/2006** Especialização  
*Especificação:*  
*Colaboração nas aulas práticas da disciplina de Técnicas em Biologia Molecular*

### 2. Escola Governador Carlos de Lima Cavalcante - CLC

---

#### Vínculo institucional

- 2009 - 2010** Vínculo: Professor , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 4, Regime: Parcial

### 3. Faculdade Frassinetti do Recife - FAFIRE

---

#### Vínculo institucional

|                    |                                                                                                                                            |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>2010 - 2010</b> | Vínculo: Professor visitante , Enquadramento funcional: Professor Titular da Espec. em Análises Clíni , Carga horária: 19, Regime: Parcial |
| <b>2009 - 2009</b> | Vínculo: Professor visitante , Enquadramento funcional: Professor Titular da Espec. em Microbiologia , Carga horária: 24, Regime: Parcial  |
| <b>2009 - 2009</b> | Vínculo: Professor visitante , Enquadramento funcional: Professor Titular da Espec. em Microbiologia , Carga horária: 24, Regime: Parcial  |

### 4. Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

---

#### Vínculo institucional

|                    |                                                                                                       |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>2008 - 2008</b> | Vínculo: Professor Convidado , Enquadramento funcional: Professor , Carga horária: 2, Regime: Parcial |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|

---

### Projetos

Projetos de pesquisaProjetos de pesquisa**2006 - 2010** Projeto Alois

Descrição: Projeto de Doutorado sendo desenvolvido pela professora Msc. Anália Nusya Medeiros Garcia, no qual participam estudantes de iniciação científica, mestrado e pesquisadores. É uma parceria entre a Reitoria da Universidade de Pernambuco e o Distrito de Fernando de Noronha.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);

Integrantes: Helker Albuquerque Macedo da Silva; Maria Tereza Cartaxo Muniz; Anália Núsia Garcia (Responsável); Ataíde Jr, Luiz

Número de produções C,T & A: 5/

Projeto de extensãoProjeto de extensão**2011 - Atual** Saúde e qualidade de vida - promoção do autocuidado

Descrição: Projeto voltado à promoção da saúde através de práticas do autocuidado a um público usuário do sistema público de saúde. Visa desenvolver ações informativas e educativas sobre as causas e consequências da desnutrição e obesidade com enfoque na instrução da população em como melhorar o padrão alimentar para a redução dos casos destes distúrbios.

Situação: Em andamento Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (9);

Integrantes: Helker Albuquerque Macedo da Silva (Responsável); ; Lívia Jordana Gois e Silva; Sammys Roxanne Sousa Silva; Cícera Suelane da Silva Gonçalves; Daniela Almeida Gonçalves; Fernanda Rodrigues da Silva; Jéssica Araújo Santana; Jessica Maria da Silva; Suanny Karoline Nogueira Silva; Moara Mirella Silva Mendonça

---

### Áreas de atuação

1. Biologia Geral
2. Citologia e Biologia Celular
3. Processos Patológicos Gerais
4. Genética

---

## Idiomas

|                  |                                                             |
|------------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>Inglês</b>    | Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem            |
| <b>Espanhol</b>  | Compreende Razoavelmente , Escreve Pouco , Lê Razoavelmente |
| <b>Português</b> | Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem            |

---

## Prêmios e títulos

|             |                                                                               |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>2008</b> | Prêmio Alois Alzheimer (2º lugar), Associação Brasileira de Alzheimer (ABRAz) |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------|

---

## Produção

---

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. SILVA, HILDSON DORNELAS ANGELO, SILVA, ALEX PAULINO, **Silva, Helker Albuquerque**, ASANO, NADJA MARIA JORGE, MAIA, MARIA DE MASCENA DINIZ, SOUZA, PAULO ROBERTO ELEUTÉRIO  
Interferon gamma and Interleukin 10 polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. Molecular Biology Reports. , v.18, p.1 - , 2014.
2. ASANO, NADJA MARIA, ANGELO, HILDSON DORNELAS, **da Silva, Helker Albuquerque**, MAIA, MARIA MASCENA, LINS, OTAVIO GOMES, SOUZA, PAULO ELEUTÉRIO  
Interleukin-6 promoter polymorphisms &#8722;174 G/C in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. Human Immunology. , v.74, p.1153 - 1156, 2013.
3. Silva, Maria Beatriz Araújo, Barreto, Ana Virgínia Matos Sá, **Silva, Helker Albuquerque da**, Galvão, Cleber, Rocha, Dayse, Jurberg, José, Gurgel-Gonçalves, Rodrigo  
Synanthropic triatomines (Hemiptera, Reduviidae) in the state of Pernambuco, Brazil: geographical distribution and natural Trypanosoma infection rates between 2006 and 2007. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Impresso). , v.45, p.60 - 65, 2012.
4. ANGELO, H.D.S., **SILVA, H. A.**, MUNIZ, M. T. C., SOUZA, P.R.E.  
Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism &#8722;308 G/A in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. Human Immunology. , v.73, p.1166 - 1170, 2012.

## Orientações e Supervisões

### Orientações e supervisões

#### Orientações e supervisões concluídas

#### Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. ROBERTA DA SILVA DE OLIVEIRA. **ASPECTOS FISIOPATOLOGICOS E GENETICOS DA DOENÇA DE AZHEIMER**. 2012. Curso (LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS) - Universidade de Pernambuco

---

## Totais de produção

### Produção bibliográfica

|                                                |   |
|------------------------------------------------|---|
| Artigos completos publicados em periódico..... | 6 |
| Apresentações de trabalhos (Congresso).....    | 6 |
| Apresentações de trabalhos (Simpósio).....     | 1 |
| Apresentações de trabalhos (Outra).....        | 1 |

### Orientações

|                                                                         |   |
|-------------------------------------------------------------------------|---|
| Orientação concluída (trabalho de conclusão de curso de graduação)..... | 1 |
|-------------------------------------------------------------------------|---|

### Eventos

|                                                                  |   |
|------------------------------------------------------------------|---|
| Participações em eventos (congresso).....                        | 2 |
| Participações em eventos (simpósio).....                         | 2 |
| Participações em eventos (encontro).....                         | 2 |
| Participações em eventos (outra).....                            | 2 |
| Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação)..... | 3 |