



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

SUELEN CRISTINA DE LIMA

**INFLUÊNCIA DOS GENES DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA *PTPN22*,  
*IFIH1* E *VDR* E DOS GENES DE REPARO DE DNA *RAD52*, *LIG4* E *STK17A* NA  
PATOGENESE DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

**Recife – PE**

**2018**

SUELEN CRISTINA DE LIMA

**INFLUÊNCIA DOS GENES DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA *PTPN22*,  
*IFIH1* E *VDR* E DOS GENES DE REPARO DE DNA *RAD52*, *LIG4* E *STK17A* NA  
PATOGENESE DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientadora:

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Paula Sandrin-Garcia**

Departamento de Genética, CB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA

Co-orientadora:

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Jaqueline de Azevêdo Silva**

Departamento de Genética, CB/UFPE;

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA

**Recife – PE**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Lima, Suelen Cristina de

Influência dos genes da imunidade inata e adaptativa PTPN22, IF1H1 e VDR e dos genes de reparo de DNA RAD52, LIG4 e STK17A na patogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico/ Suelen Cristina de Lima- 2018.

97 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Paula Sandrin-Garcia

Coorientadora: Jaqueline de Azevêdo Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2018.

Inclui referências

1. Lupus Eritematoso Sistêmico 2. Genes 3. Imunidade I. Sandrin-Garcia, Paula (orient.) II. Silva, Jaqueline de Azevêdo (coorient.) III. Título

616.772

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-149

Elaborado por Elaine C. Barroso CRB4/1728

**SUELEN CRISTINA DE LIMA**

**INFLUÊNCIA DOS GENES DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA *PTPN22*,  
*IFIH1* E *VDR* E DOS GENES DE REPARO DE DNA *RAD52*, *LIG4* E *STK17A* NA  
PATOGÊNESE DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovado(a) em: 28/02/2018

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Paula Sandrin-Garcia**  
**Orientadora**

Departamento de Genética, CCB/UFPE  
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA

---

**Dr<sup>ª</sup>. Nadja Maria Jorge Asano**

Hospital das Clínicas de Pernambuco – HCPE  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

**Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza**

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

---

**Dr. Will de Barros Pita**

Departamento de Antibióticos  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

**Dr. Ronaldo Celerino da Silva**

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dedico à minha família, por todo amor e suporte.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a **Deus**, por ser essa energia propulsora que me move a cada dia. Agradeço pela oportunidade de aprender cada dia mais, pela força, para seguir em frente e alcançar meus objetivos, e sabedoria para entender que os percalços na nossa jornada é que nos fazem crescer e que nos fortalecem.

Aos meus pais **Aparecida Lima** e **Joaquim Lima**, por serem os maiores exemplos de perseverança, amor e dedicação em minha vida. Por sempre me mostrarem que o trabalho duro gera frutos e que as sementes que plantamos, se bem cuidadas, florescem. Agradeço por todo esforço que fizeram para me dar uma boa educação, que sem dúvidas me proporcionou chegar até aqui.

Ao meu marido **Alexsandro Silva**, meu parceiro e melhor amigo, que ao longo dessa jornada foi psicólogo, educador físico, terapeuta, contador... um sem número de atribuições que sem dúvida tornam minha vida mais leve. Muito obrigada por nunca me deixar desistir dos meus sonhos, por me fazer feliz e por me fazer sentir-me tão amada todos os dias desses 14 anos de união.

Ao meu irmão **Yúri Lima**, que me enche de alegria e orgulho, por ser tão esforçado, inteligente, carinhoso e atencioso. Muito obrigada por existir em minha vida.

Às minhas orientadoras **Paula Sandrin** e **Jaqueline Azevêdo**, por terem me acolhido desde o primeiro momento, pela paciência ao longo do meu aprendizado e por serem pessoas e pesquisadoras fantásticas, que eu tanto admiro. Agradeço pela amizade, pelos ensinamentos e pelo apoio em minha formação e em minha vida. Vocês são um exemplo para mim!

Aos meus amigos do laboratório, que se fizeram tão presentes em meu cotidiano nestes anos: **Maria Eduarda, Natassia Jarvovski, Jorge Pereira, Camilla Lima, Eduardo Adelino** e **Ronaldo Celerino**. Obrigada por sempre estarem presentes tanto nos ensinamentos como nos momentos de descontração, que me proporcionaram momentos de amizade sincera e aprendizado mútuo.

Aos amigos do grupo PATGEN agradeço pelas colaborações, pelas reuniões científicas, congressos e conversas. Cada membro deste grupo certamente impactou de algum modo este trabalho. Afinal, cada conquista individual é uma vitória de todos!

Aos membros das bancas de qualificação e defesa desta Tese que gentilmente aceitaram o convite para participar de tais eventos e colaboraram com sugestões e críticas que ajudaram a engrandecer este trabalho.

Agradeço a todos os pacientes voluntários desta pesquisa, pois sem eles não haveria pesquisa alguma. É por saber de sua luta diária contra uma doença tão complexa como é o Lúpus, que nós pesquisadores nos empenhamos para entender cada dia mais os seus mecanismos.

Aos colegas, professores e funcionários do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami, por serem sempre muito receptivos e prestativos.

Agradeço por fim, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por me fornecer uma bolsa de estudos neste período.

**Muito Obrigada!**

“When you've suffered enough and your spirit is breaking [...]  
...remember you're loved and you always will be.  
This melody will bring you right back home.  
When life leaves us blind, love keeps us kind...”

The Messenger - Linkin Park  
(*In memoriam* of Chester Bennington)

## RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune caracterizada por uma resposta inflamatória inapropriada e alterada resultando em inflamação e dano tecidual. Diversos fatores possuem papel relevante no surgimento da doença, em particular, os fatores ambientais e genéticos. Tendo em vista que a imunidade inata e adaptativa e o reparo a danos no DNA apresentam-se alterados em indivíduos com LES, o objetivo do presente estudo foi avaliar alguns genes envolvidos nesses mecanismos, tais como: *PTPN22*, *IFIH1*, *VDR*, *RAD52*, *LIG4* e *STK17A*. Para tanto, foram utilizadas como ferramentas: meta-análises, estudos de associação e análise do perfil de expressão. Foram conduzidas duas meta-análises, envolvendo os SNPs rs2476601 (*PTPN22*) e rs1990760 (*IFIH1*). Os estudos de associação incluíram SNPs dos genes *RAD52*, *LIG4*, *STK17A*, *IFIH1* e *VDR*. Além disso, foi avaliada a expressão gênica do *RAD52* e do *VDR*. A meta-análise conduzida a partir do SNP rs2476601 do *PTPN22* demonstrou que o alelo T ( $p= 0,000$ ) e o genótipo T/T ( $p= 0,03$ ) estão associados à uma maior susceptibilidade ao LES. Além disso, identificamos influência étnica na associação do mesmo SNP com a susceptibilidade à doença, nas populações Caucasiana ( $p=0,000$ ) e Latina ( $p= 0,000$ ). A meta-análise com o SNP rs1990760 do *IFIH1* mostrou associação entre o alelo C ( $p= 0,026$ ) e uma menor susceptibilidade ao LES, entretanto o estudo de associação dos 4 SNPs desse gene em duas diferentes populações brasileiras não detectou associação com a susceptibilidade ao LES ou suas características clínicas. O estudo de associação genética dos 7 SNPs do *VDR* mostrou associação entre o genótipo G/G ( $p= 0,008$ ) do rs11168268 e uma maior susceptibilidade ao LES e entre o alelo G ( $p= 0,01$ ) e genótipos A/G ( $p= 0,01$ ) e G/G ( $p= 0,02$ ) do rs2228570 a uma menor susceptibilidade ao LES. Além disso, alguns destes 7 SNPs ainda foram associados à características clínicas do LES: fotossensibilidade (rs4760658), nefrite (rs11168268), anticorpo anti-dsDNA (rs1540339), e serosite (rs3890733). O perfil de expressão do *VDR* indicou uma menor expressão gênica (-10,51 FC) em pacientes lúpicos quando comparado aos indivíduos saudáveis. Também foi detectado níveis diferenciais de expressão do *VDR* em relação às características clínicas: alterações de pele (+1,3 FC) e nefrite (-5,7 FC), bem como em relação aos genótipos do Cdx-2 A/G e G/G (-9,6 e -12,6 FC, respectivamente). O estudo de associação dos genes de reparo do DNA demonstrou que o alelo T ( $p= 0,029$ ) do SNP rs1051669 do *RAD52* estava associado a uma maior susceptibilidade ao LES, embora o alelo T ( $p= 0,027$ ) e o genótipo T/T ( $p= 0,006$ ) desse mesmo polimorfismo estivessem associados a uma menor susceptibilidade a úlceras orais. Além disso, o perfil de expressão do *RAD52* mostrou-se diminuído (-7,23 FC) em pacientes com LES quando comparado a indivíduos saudáveis e houve expressão diferencial para as seguintes características clínicas: alterações de pele (+4,7 FC) e nefrite (-10,3 FC). Ainda, o genótipo G/T ( $p= 0,018$ ) do SNP rs3093740 do *LIG4* foi associado à uma menor susceptibilidade a nefrite e o alelo A ( $p= 0,007$ ) e o genótipo A/A ( $p= 0,010$ ) do SNP rs2330875 do *STK17A*, foram associados à uma menor susceptibilidade a rash malar. Os dados obtidos nesse estudo reforçam a importância do componente genético na imunidade inata e adaptativa e no reparo a danos no DNA, sugerindo o uso destes genes como marcadores genéticos para o LES.

**Palavras-chave:** Genes de Reparo do DNA. Imunidade Inata e Adaptativa. Lúpus Eritematoso Sistêmico. SNPs.

## ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by an inappropriate and altered inflammatory response resulting in inflammation and tissue damage. Several factors play a relevant role in the disease's onset, in particular environmental and genetic factors. Since innate and adaptive immunity and DNA repair pathways are altered in individuals with SLE, the objective of the present study was to evaluate some genes involved in these mechanisms, such as: *PTPN22*, *IFIH1*, *VDR*, *RAD52*, *LIG4* and *STK17A*. For this purpose, the following tools were used: meta-analyses, association studies and expression profile assays. Were conducted two meta-analyses, involving rs2476601 (*PTPN22*) and rs1990760 (*IFIH1*). Association studies, were performed including *RAD52*, *LIG4*, *STK17A*, *IFIH1* and *VDR* SNPs. In addition, the *RAD52* and *VDR* gene expression was evaluated. Meta-analysis conducted from *PTPN22* SNP rs2476601 showed that the T allele ( $p= 0.000$ ) and the T/T genotype ( $p= 0.03$ ) were associated with increased SLE susceptibility. In addition, we identified ethnic influence in association of the same SNP with disease's susceptibility in Caucasian ( $p= 0.000$ ) and Latin ( $p= 0.000$ ) populations. The meta-analysis with *IFIH1* SNP rs1990760 showed an association between the C allele ( $p= 0.026$ ) and a lower SLE susceptibility, however the association study of the 4 SNPs of this gene in two different Brazilian populations did not found association with SLE susceptibility or its clinical characteristics. The genetic association study of 7 *VDR* SNPs showed an association between the G/G genotype ( $p= 0.008$ ) and rs11168268 and a greater SLE susceptibility and between the G allele ( $p= 0.01$ ) and genotypes A/G ( $p= 0.01$ ) and G/G ( $p= 0.02$ ) of rs2228570 to a lower SLE susceptibility. In addition, some SNPs have still associated to clinical features: photosensitivity (rs4760658), nephritic disorder (rs11168268), anti-dsDNA antibody (rs1540339), and serositis (rs3890733). The *VDR* expression profile indicated a lower gene expression (-10.51 FC) in lupus patients when compared to healthy individuals. Differential levels of *VDR* expression were also detected in relation to the clinical characteristics: skin alterations (+1.3 FC) and nephritic disorder (-5.7 FC), as well as in relation to Cdx-2 A/G and G/G genotypes (-9.6 and -12.6 FC, respectively). The association study of DNA repair genes demonstrated that the T allele ( $p= 0.029$ ) of the *RAD52* SNP rs1051669 was associated with a greater SLE susceptibility, although the T allele ( $p= 0.027$ ) and the T/T genotype ( $p= 0.006$ ) of this same polymorphism were associated with a lower susceptibility to oral ulcers. In addition, the expression profile of *RAD52* was decreased (-7.23 FC) in SLE patients when compared to healthy individuals and there was differential expression for the following clinical characteristics: skin alterations (+4.7 FC) and nephritic disorders (-10.3 FC). Furthermore, the G/T genotype ( $p= 0.018$ ) of the *LIG4* SNP rs3093740 was associated with a lower susceptibility to nephritic disorder and the A allele ( $p= 0.007$ ) and the genotype A/A ( $p= 0.010$ ) of the *STK17A* SNP rs2330875 were associated with a lower susceptibility to malar rash. The data obtained in this study reinforce the importance of the genetic component in innate and adaptive immunity and DNA repair pathways, suggesting the use of these genes as SLE genetic markers.

**Keywords:** DNA Repair Genes. Innate and Adaptive Immunity. Systemic Lupus Erythematosus. SNPs.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Falhas no “clearance” dos corpos apoptóticos em indivíduos lúpicos promove liberação de auto-antígenos formando imunocomplexos que estimulam a produção de interferons. Os interferons por sua vez promovem o processo inflamatório crônico no LES. Modificado de CLARK & POOLE, 2012. ....22
- Figura 2** - Etiopatogenia do Lúpus Eritematoso Sistêmico. Fonte: Modificado de HAHN, 2012. ....23
- Figura 3** - Órgãos e sistemas afetados pelo Lúpus Eritematoso Sistêmico. Modificado de CRAMPTON et al., 2014. ....24
- Figura 4** - Características clínicas nos pacientes com LES. a) rash malar b) alopecia. Fonte: <http://www.portaled.com.br/blog/especialidades-da-pediatria/reumatologia/lupus-eritematoso-em-pediatria-novos-criteriosdiagnosticos-e-tratamento-inicial/> <Acesso em: 21/01//2018>. ....26
- Figura 5** - Emissão após bloqueio da camada de ozônio na superfície da terra e comprimento de ondas das radiações UVA, UVB e UVC. Modificado de PFEIFER & BESARATINIA, 2012. ....29
- Figura 6** - Efeitos das radiações UVA e UVB na molécula de DNA. Os principais efeitos da ação da radiação UV são dímeros de pirimidina ciclobutano e DSB, que podem surgir indiretamente através da ação de ROS.....30
- Figura 7** - O vírus Epstein Barr codifica pequenos RNAs chamados EBER que induzem a sinalização de TLR3 e TLR9 ativando as células T e NK através da secreção de IL-12 e interferon do tipo I (IFN $\alpha$  /  $\beta$ ), respectivamente. Modificado de MÜNZ, 2014. ....33
- Figura 8** - Estrutura do gene PTPN22 em duas isoformas transcritas e seis SNPs. O SNP R620W (rs2476601) C1858T provoca a substituição de um aminoácido arginina no códon 620 (CGG) por um triptofano (TGG) da proteína Lyp. Modificado de PRADHAN et al., 2010. ....36

<b>Figura 9</b> - Representação esquemática do gene IFIH1. O SNP C>T rs1990760 (Ala946Thr) do IFIH1 apresenta-se associado ao LES em estudos conduzidos em diversas populações. Fonte: BOUÇAS et al., 2013. ....	38
<b>Figura 10</b> - Estrutura do gene VDR. As posições dos SNPs rs11168268, rs2248098, rs4760648, rs3890733, Cdx-2 e Fok-I estão destacadas e as caixas pontilhadas indicam os respectivos TagSNPs. Modificado de DE AZEVÊDO SILVA et al., 2013. ....	42
<b>Figura 11</b> - Recombinação Homóloga e Não Homóloga no reparo de DSBs. Modificado de PENG & LIN, 2011. ....	44
<b>Figura 12</b> - a) Estrutura do gene RAD52 e localização de 3 TagSNPs (rs1051669, rs11064607 e rs3748522). b) Posição dos TagSNPs em gráfico LD gerado pelo software Haploview. Fonte: DE AZEVÊDO SILVA et al., 2014. ....	46
<b>Figura 13</b> - a) Estrutura do gene LIG4 e localização de 4 TagSNPs (rs10131, rs1805386, rs1805388 e rs3093740). b) Posição dos TagSNPs em gráfico LD gerado pelo software Haploview. Fonte: DE AZEVÊDO SILVA et al., 2014. ....	48
<b>Figura 14</b> - Estrutura do gene LIG4 e localização de 5 TagSNPs (rs2330875, rs7802995, rs7805969, rs10259269 e rs15866). ....	50
<b>Figura 15</b> - Posição dos 5 TagSNPs (rs2330875, rs7802995, rs7805969, rs10259269 e rs15866) do gene STK17A em gráfico LD gerado pelo software Haploview. Fonte: DA SILVA FONSECA et al., 2013.....	51
<b>Figura 16</b> - Representação esquemática da ação dos genes PTPN22, IFIH1, VDR, LIG4, RAD52 e STK17A na patogênese do LES. ....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Critérios de classificação para o LES segundo o Colégio Americano de Reumatologia revisados em 1997 (HOCHBERG, 1997).....	25
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Item</b>	<b>Definição</b>
ACR	<i>American College of Rheumatology</i> (Colégio Americano de Reumatologia)
anti-RNP	anti- ribonucleoproteína
anti-Sm	anti-Smith
B19	Parvovírus B19
CDP	cyclobutane pyrimidine dimer (dímeros de primidina e ciclobutano)
Cdx2	<i>caudal-related homeobox transcription factor 2</i>
CpD	<i>Cytosine-phosphate-Guanine</i>
Csk	<i>C-terminal Src kinase</i>
CTR	<i>T-cell receptor</i> (receptor de célula T)
DAPK	<i>Death-associated protein kinase</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DRAK1	Death-Associated Protein Kinase-Related 1
DSB	<i>Double Strand Break</i> (Quebra de dupla fita)
dsDNA	<i>Double-stranded DNA</i>
dsRNA	<i>Double-stranded RNA</i>
EBER	<i>Epstein-Barr encoding region</i>
EBV	Epstein Barr Vírus
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i> (quinase regulada por sinal extracelular)
FAN	Fator anti-nuclear
GWAS	<i>Genome wide association study</i> (Estudo amplo de associação de genômica)
HCMV	<i>Human cytomegalovirus</i> (citomegalovírus humano)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (antígeno leucocitário humano)
HR	<i>Homologous Recombination</i> (Recombinação Homóloga)

HTLV	<i>Human T lymphotropic virus</i> (vírus linfotrópico de células T humanas)
IFIH1	<i>Interferon induced with helicase C domain</i> (Interferon induzido com domínio helicase C)
IFN	<i>Interferon</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	<i>Interleucin</i> (Interleucina)
JNK	<i>Jun N-terminal kinases</i>
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LGP2	<i>Laboratory of Genetics and Physiology 2</i>
LIG4	<i>DNA Ligase 4</i>
LyP	<i>lymphoid-specific tyrosine phosphatase</i> (fosfatase específica linfoide citoplasmática)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (proteína quinase ativada por mitógeno)
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i>
MiRNA	Micro RNA
NHEJ	<i>Non-homologous End Joining</i> (Junção de extremidades não homólogas)
NK	<i>Natural Killer</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
PTPN22	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22</i> ( Proteína tirosina fosfatase – sem receptor tipo 22)
RAD52	RAD52 ( <i>radiation-repair gene 52</i> ) homólogo ( <i>S. cerevisiae</i> )
RIG-1	<i>retinoic acid inducible gene 1</i>
RLR	<i>RIG-I-like Receptors</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido Ribonucléico)
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (espécies reativas do oxigênio)
SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de Base Única)
SSB	<i>Single Strand Break</i> (Quebra de fita simples)
STK17A	<i>Serine/threonine kinase 17a</i> (Serina/treonina quinase 17A)

Th	<i>T helper</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i> (Região Não Traduzida)
UV	Ultra Violeta
VDR	<i>Vitamin D receptor</i> (Receptor de Vitamina D)
XRCC	<i>X-Ray Repair cross-complementing protein</i> (Proteína de reparo de raio-X de complemento cruzado)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1	CARACTERIZAÇÃO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO .....	19
2.2	EPIDEMIOLOGIA DO LES .....	20
2.3	IMUNOPATOGÊNESE DO LES .....	21
2.4	DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DO LES .....	23
2.5	TRATAMENTO DO LES .....	28
2.6	INFLUÊNCIA AMBIENTAL NO LES .....	28
<b>2.6.1</b>	<b>Radiação Ultravioleta</b> .....	<b>28</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Vírus Epstein Barr</b> .....	<b>32</b>
2.7	GENÉTICA DO LES .....	34
2.8	GENES DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA NO LES .....	34
<b>2.8.1</b>	<b>Gene PTPN22</b> .....	<b>35</b>
<b>2.8.2</b>	<b>Gene IFIH1</b> .....	<b>36</b>
<b>2.8.3</b>	<b>Gene VDR</b> .....	<b>39</b>
2.9	GENES DE REPARO DE DNA NO LES .....	43
<b>2.9.1</b>	<b>Gene RAD52</b> .....	<b>44</b>
<b>2.9.2</b>	<b>Gene LIG4</b> .....	<b>47</b>
<b>2.9.3</b>	<b>Gene STK17A</b> .....	<b>49</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>52</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	52
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
	<b>ARTIGO 1</b> .....	<b>53</b>
	<b>ARTIGO 2</b> .....	<b>57</b>
	<b>ARTIGO 3</b> .....	<b>61</b>

<b>ARTIGO 4 .....</b>	<b>65</b>
<b>4 DISCUSSÃO GERAL .....</b>	<b>69</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>92</b>
APÊNDICE 1 .....	92
APÊNDICE 2 .....	95

## 1 INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune caracterizada por uma resposta inflamatória alterada, onde o sistema imune perde a capacidade de diferenciar o próprio do não-próprio (RAHMAN, 2008; TSOKOS, 2011; PIETERSE & VAN DER VLAG, 2014). Diversos fatores podem influenciar na patogênese do LES, mas os principais são os fatores ambientais e genéticos (VILAR & SATO, 2002; TSOKOS, 2011). Entre os fatores ambientais, um dos principais promotores de injúrias no LES é a exposição à Radiação Ultravioleta (UV) emitida pelo sol, justificando inclusive aumento das taxas de incidência e prevalência da doença em regiões com maior taxa de exposição solar (VILAR & SATO, 2002; NAKASHIMA et al., 2011; KIM & CHONG, 2013). Além disso, o vírus Epstein Barr (EBV) é amplamente abordado como um fator desencadeante do LES, devido ao mimetismo molecular diante de auto-antígenos induzindo a produção de auto-anticorpos (KOSMINSKY et al., 2006; DRABORG et al., 2012).

Quanto aos fatores genéticos, a doença é resultado de um efeito combinado de variações em um grande número de genes, tais como polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) (TSOKOS, 2011). Quando os fatores genéticos se apresentam em conjunto com fatores ambientais podem ocorrer respostas imunes anormais, com consequente ativação das respostas inata e adaptativa contra o próprio organismo (WEIDENBUSCH et al., 2017). Alterações na imunidade inata contribuem tanto para o dano tecidual através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como induzem a formação de auto-antígenos, que por sua vez, induzem respostas imunes adaptativas através da ativação anormal de linfócitos T e B autorreativos (HAHN, 2012).

Diversos genes envolvidos na regulação dos mecanismos da imunidade inata e adaptativa vem sendo estudados em doenças autoimunes. O gene PTPN22 atua na imunidade adaptativa através da ativação dos linfócitos T e o polimorfismo R620W vem sendo alvo de diversos estudos de associação em diferentes populações (BURN et al., 2011; STANFORD et al., 2012). O gene *IFIH1*, participa diretamente da imunidade inata e está associado a níveis séricos elevados de  $IFN\alpha$ . O polimorfismo C>T rs1990760 (Ala946Thr) do *IFIH1* apresenta-se associado ao LES em diversos estudos (HARLEY, 2009; GATEVA et al., 2009; MOLINEROS et al., 2013; ENEVOLD

et al., 2014). Alguns genes, por sua vez, contribuem tanto com a imunidade inata quanto adaptativa, como é o caso do *VDR* (receptor de vitamina D). A associação de variantes do *VDR* com a susceptibilidade ao LES vem sendo descrita em diversas populações (ZHOU et al., 2015; HU et al., 2016).

A maioria dos polimorfismos associados ao LES está em regiões não codificadoras do DNA de genes relacionados à resposta imune (HOCHBERG et al., 2016). Adicionalmente, genes envolvidos no reparo a danos no DNA vêm sendo estudados como possíveis marcadores moleculares para o LES, tendo em vista que indivíduos lúpicos apresentam quebras na dupla fita do DNA (DSBs) induzidos através de espécies reativas do oxigênio (ROS), da replicação do DNA ou mesmo por estresse ambiental. As células danificadas podem seguir por duas vias de reparo: recombinação homóloga (HR) e recombinação não homóloga (NHEJ) (TSAI & LIEBER, 2010; NEAL & MEEK, 2011). O gene *RAD52* é um dos mais importantes para a manutenção da integridade do DNA, pois codifica uma proteína de mesmo nome que atua diretamente na HR representando um papel chave nesta via (HIOM, 1999; DANOY et al., 2008). Embora a HR seja uma via mais específica, a NHEJ é a mais frequente via de reparo de DSBs, onde a proteína *LIG4*, codificada pelo gene *LIG4*, atua em associação com a proteína *XRCC4* (FRANK, et al., 1998). O knockout do gene *LIG4* promove extrema radiosensibilidade e comprometimento do reparo de DSBs (OH et al., 2013). O gene *STK17A*, por sua vez, está envolvido na regulação de processos nucleares, na resposta a danos no DNA e na regulação de ROS no processo metabólico (SANJO et al., 1998; MAO et al., 2011). Sanjo e colaboradores (1998) sugeriram que a expressão de *STK17A* pode ser ativada em resposta à estímulos externos, como a Radiação UV e certas drogas.

Uma vez que as vias de atuação da imunidade inata e adaptativa e de reparo a danos no DNA podem se apresentar comprometidas nos pacientes com LES frente à exposição à agentes ambientais, e que esses mecanismos ainda não estão elucidados, nosso objetivo nesse estudo foi entender como os genes *PTPN22*, *IFIH1* e *VDR*, que atuam na imunidade inata e adaptativa e dos genes *RAD52*, *LIG4* e *STK17A*, que atuam nas vias de reparo a danos no DNA, podem influenciar a susceptibilidade e o aparecimento das diversas características clínicas da doença.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune, de etiologia multifatorial e multigênica que pode afetar todos os órgãos e sistemas do corpo (WAKELAND et al., 2001). Dentre as mais de 80 doenças autoimunes conhecidas, o LES se destaca por apresentar características clínicas diversas e que evoluem cronicamente com fases de exacerbação e períodos de remissão da doença (MOK & LAU, 2003; CAMPBELL, 2014).

As doenças autoimunes ocorrem quando o sistema imunológico sofre uma falha no processo de tolerância imunológica e passa a atacar tecidos saudáveis do próprio corpo, pois perde a capacidade de diferenciar o próprio do não-próprio (RAHMAN, 2008; TSOKOS, 2011; PIETERSE & VAN DER VLAG, 2014). A perda da tolerância imunológica provoca a produção de auto-anticorpos dirigidos principalmente contra antígenos nucleares, que levam as células à apoptose com subsequente formação de corpos apoptóticos, gerando imunocomplexos que ao se depositarem nos tecidos promovem lesão tecidual imunologicamente mediada. Este processo leva os órgãos e sistemas a um estado de inflamação aguda, que na maioria dos casos leva à cronicidade (MOK & LAU, 2003; GILES & BOACKLE, 2013).

A predisposição genética ao LES é um dos principais fatores que influenciam na patogênese da doença em conjunto com fatores hormonais, ambientais, infecciosos e imunológicos (VILAR & SATO, 2002; TSOKOS, 2011; KIM & CHONG, 2013). O LES apresenta etiopatogenia multifatorial onde há o envolvimento de fatores que trabalham em conjunto para o desenvolvimento e progressão da doença. Estudos realizados com gêmeos sugeriram que a susceptibilidade ao LES devida à fatores genéticos corresponde a cerca de 30 a 40% (REICHILIN et al., 1992).

Alguns estudos apontam os fatores ambientais, como as radiações ionizantes e não-ionizantes, como gatilhos cruciais ao desenvolvimento do LES (KUHN et al., 2010; KUHN et al., 2011; KIM & CHONG, 2013). A Irradiação Ultravioleta emitida pelo Sol, inclusive, é conhecida como um dos principais promotores de injúrias no LES (KUHN et al., 2011; PATSINAKIDIS et al., 2012).

O vírus Epstein Barr (EBV) também atua como agente ambiental externo que pode desencadear a patologia devido ao mimetismo molecular que exerce, promovendo quebra da tolerância imunológica (DRABORG et al., 2016). Alguns fármacos, por sua vez, como a hidralazina, procainamida, isoniazida, miltidopa, clorpromazina, quinidona, minociclina, betabloqueadores, agentes anti-TNF, entre outros, podem atuar também como agentes desencadeantes na patologia do LES (MOTA et al., 2007).

Fatores hormonais como variações nos níveis de estrógeno também são estudados como possíveis fatores desencadeantes da doença, explicando inclusive a predisposição aumentada em mulheres de apresentar a doença (KYTTARIS et al., 2010; KHAN & AHMED, 2015). A cada 10 pessoas portadoras da doença 9 são mulheres, principalmente mulheres jovens entre as fases de menarca e menopausa, tendo em vista que nesses períodos há uma desregulação hormonal característica (URAMOTO et al., 1999).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA DO LES

Estudos epidemiológicos relatando incidência e prevalência do LES vem sendo realizados em diversos países, porém até a década de 1950 estudos de prevalência eram escassos tendo em vista que o LES era considerado uma doença rara e o diagnóstico clínico e laboratorial era bastante impreciso. Com o maior conhecimento da doença e o auxílio de testes laboratoriais o diagnóstico eficaz vem contribuindo com a notificação e conseqüente aumento da prevalência do LES (URAMOTO et al., 1999).

A incidência mundial da doença, segundo estudos realizados nas últimas décadas, pode variar entre 1 a 10 novos casos para cada 100.000 pessoas/ano, enquanto que a prevalência varia entre 20 a 150 casos a cada 100.000 indivíduos (PONS-ESTEL et al., 2010; TSOKOS, 2011). No Brasil dois estudos foram realizados abordando a epidemiologia do LES. No primeiro estudo, realizado em Natal no Rio Grande do Norte, Vilar & Sato (2002) registraram uma incidência anual de 8,7 a cada 100.000 pessoas, com maior frequência em mulheres (14,1: 2,2). Entretanto, no

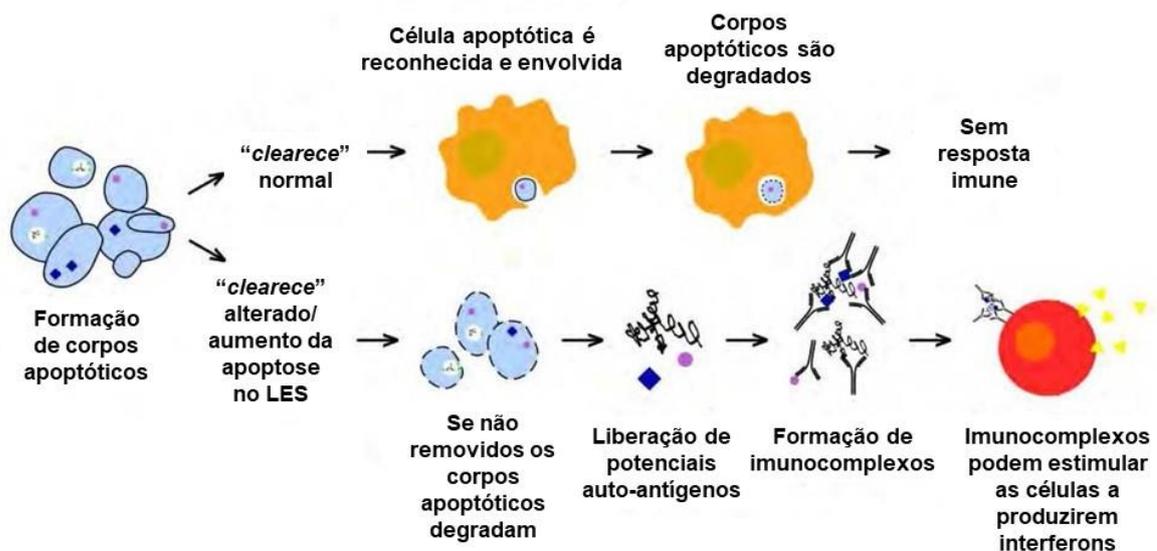
estudo realizado em Cascavel no estado do Paraná, Nakashima e colaboradores (2011) verificaram uma incidência de 4,8 casos por 100.000 habitantes/ano. O que se observa é que, possivelmente, a ação de diferentes taxas de exposição aos raios UV encontradas entre as duas regiões justificaria a diferença de incidências encontradas entre as cidades de Natal e Cascavel (VILAR & SATO, 2002; NAKASHIMA et al., 2011), assim como a composição étnica das cidades, uma vez que em Natal, o percentual de pardos e negros é superior à cidade de Cascavel (NAKASHIMA et al., 2011).

O LES acomete indivíduos de todas as raças, porém, em estudos norte-americanos, sua prevalência é três a quatro vezes maior em mulheres negras do que em brancas. O predomínio da doença em mulheres ocorre em todas as faixas etárias e é mais marcante entre os 15 e 64 anos de idade e bem menos importante nas crianças e nos idosos (RUSS & HOCHBERG, 2001; SATO, 2008). Pesquisas demonstram que a média de idade do diagnóstico de LES é em torno de 31 a 50 anos e mulheres, principalmente na idade reprodutiva, são mais afetadas do que os homens (URAMOTO et al., 1999). O LES também pode surgir em crianças e idosos. Entretanto, nestes grupos, a taxa de mulheres e homens afetados não varia da mesma forma que em adultos, sugerindo assim a influência dos fatores hormonais na doença (KYTTARIS et al., 2010).

### 2.3 IMUNOPATOGENESE DO LES

No LES a autoimunidade ocorre como consequência da quebra da autotolerância imunológica diante de stress oxidativo, infecções, lesões teciduais entre outras injúrias. A patologia do LES se inicia a partir do processo de injúria à molécula de DNA, onde podem ocorrer dois tipos de quebras, que podem ser quebras simples do DNA, as SSBs (*single strand breaks*) e quebras duplas no DNA, as DSBs (*double strand breaks*). Quando essas quebras no DNA não são eficientemente reparadas ocorre o processo de morte celular programada, a apoptose (TSAI & LIEBER, 2010; NEAL & MEEK, 2011).

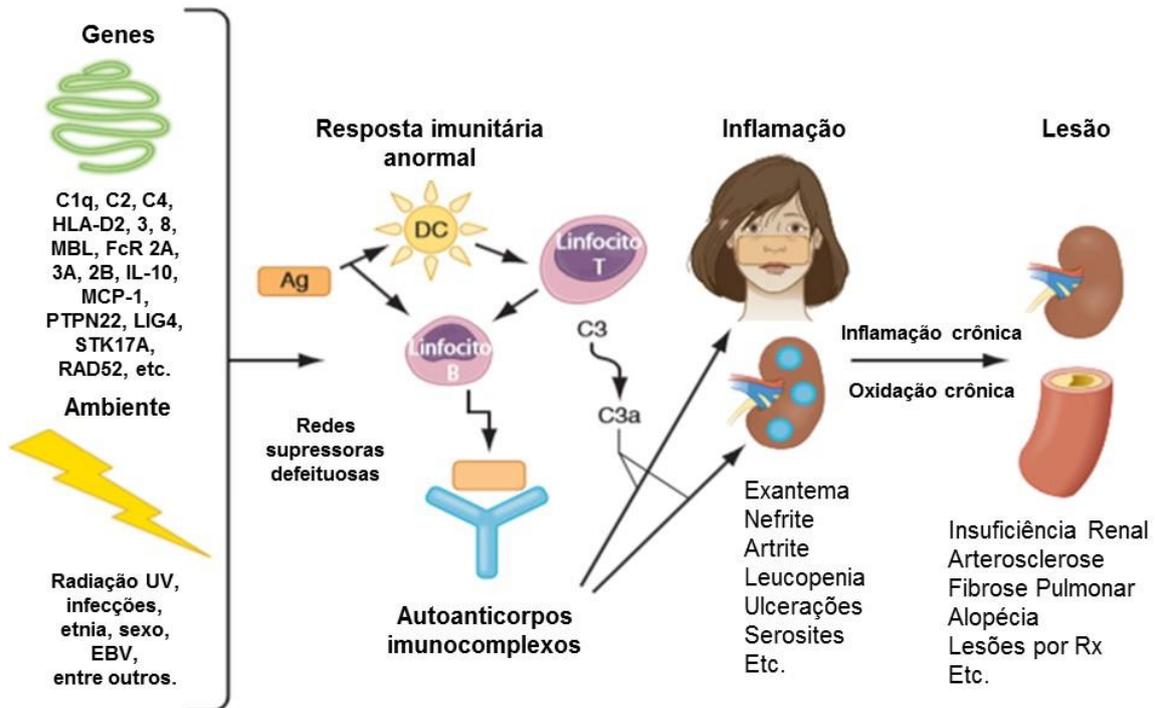
O que se observa é que nos indivíduos com LES há um defeito no “*clearance*” de células apoptóticas, o que provoca a atuação do sistema imunológico por meio da apresentação de auto-antígenos, promovendo a perda da tolerância imunológica, ativação policlonal de linfócitos B, produção de auto-anticorpos, diminuição do “*clearance*” de imunocomplexos e falha nos mecanismos supressores e de regulação imunológica (Figura 1). Os anticorpos dirigidos contra antígenos de superfície de membranas celulares levam a destruição dessas células pelo sistema fagocitário mononuclear, além disso, células imunocompetentes atuam contra as células próprias através de citotoxicidade por intermédio da ativação de linfócitos T e B, com consequente formação de auto-anticorpos e imunocomplexos (MOK & LAU, 2003; HAHN, 2012; RAHMAN, 2008; TSOKOS, 2011).



**Figura 1** - Falhas no “*clearance*” dos corpos apoptóticos em indivíduos lúpicos promove liberação de auto-antígenos formando imunocomplexos que estimulam a produção de interferons. Os interferons por sua vez promovem o processo inflamatório crônico no LES. Modificado de CLARK & POOLE, 2012.

Defeitos na regulação imunológica provocam lesão tecidual no LES em decorrência da formação e da deposição de imunocomplexos, que devido à ativação do sistema do complemento promovem o processo inflamatório crônico. Imunocomplexos compostos por auto-antígenos e anticorpos derivados destas células

são formados e se depositam em vários tecidos e/ou órgãos tais como o rim, articulações, pleura, entre outros, o que conduz a danos graves nestes órgãos (Figura 2) (MOK & LAU, 2003; RAHMAN, 2008; TSOKOS, 2011; HAHN, 2012).



**Figura 2 -** Etiopatogenia do Lúpus Eritematoso Sistêmico. Fonte: Modificado de HAHN, 2012.

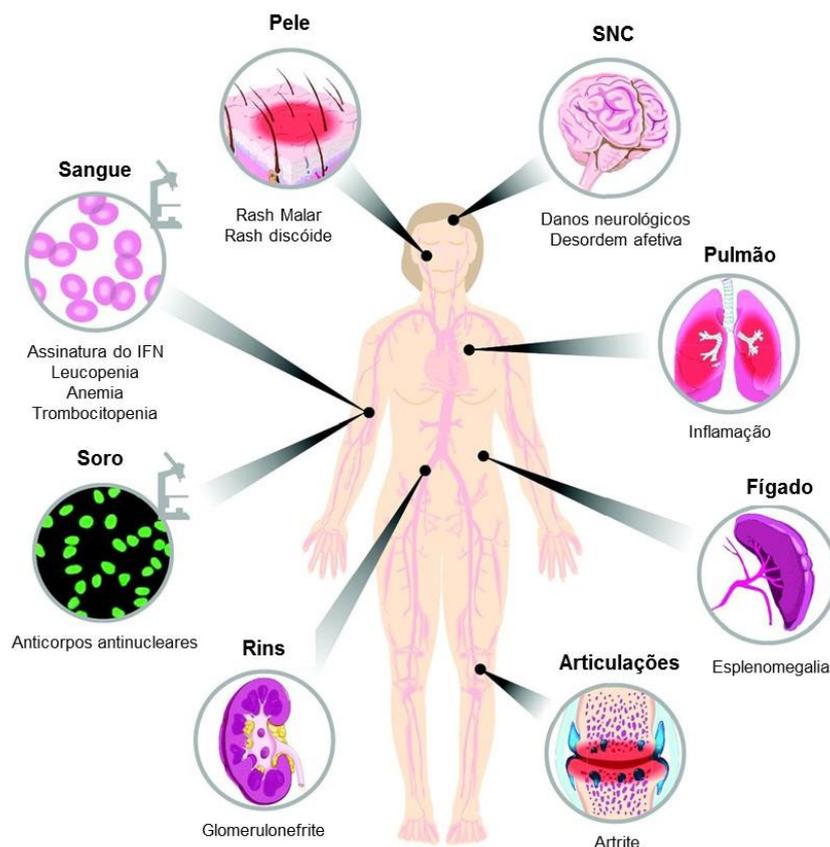
Em indivíduos normais o padrão de auto-anticorpos, caracteriza-se por um baixo título, baixa especificidade e baixa afinidade e são da classe IgM. No LES os auto-anticorpos são de alta especificidade e elevada afinidade, além de serem da classe IgG, caracterizando-se como auto-anticorpos patogênicos (MOK & LAU, 2003).

## 2.4 DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DO LES

O diagnóstico no LES se inicia com a avaliação das características clínicas, ditadas pelos critérios do *American College of Rheumatology* (ACR) através do qual, por intermédio de anamnese associado a exames laboratoriais, o médico terá o diagnóstico conclusivo. Os exames laboratoriais são de grande importância para a

definição da atividade da doença. O teste FAN (fator ou anticorpo antinuclear) é o principal exame laboratorial para o LES, contudo, apresenta baixa especificidade. Outros testes como os de anticorpos anti-Sm e anti-DNA também são utilizados no diagnóstico do LES, no entanto, apenas 40% a 50% dos pacientes com LES apresentam tais marcadores (SATO, 2008).

As manifestações clínicas do LES são diversas, afetando órgãos e tecidos, variando em número e intensidade de acordo com a atividade ou remissão da doença (Figura 3) (SATO et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2003).



**Figura 3** - Órgãos e sistemas afetados pelo Lúpus Eritematoso Sistêmico. Modificado de CRAMPTON et al., 2014.

Sendo assim para o diagnóstico de LES utilizam-se 11 critérios de classificação do ACR propostos em 1982, e revisados em 1997, como descrito na Tabela 1 (TAN et al., 1982; HOCHBERG, 1997). A presença de quatro das onze manifestações clínicas descritas pelo critério ACR são obrigatórias para determinar o diagnóstico da doença (BORBA et al., 2008).

**Tabela 1** - Critérios de classificação para o LES segundo o Colégio Americano de Reumatologia revisados em 1997 (HOCHBERG, 1997).

Critérios de classificação para o Lúpus Eritematoso Sistêmico	
Característica clínica	Descrição
1. Eritema Malar	Lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo
2. Lesão discóide	Lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.
3. Fotossensibilidade	Exantema cutâneo como reação não usual à exposição à luz solar, de acordo com a história do paciente ou observado pelo médico.
4. Úlceras Orais/Nasais	Úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente indolores, observadas pelo médico.
5. Artrite	Não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor e edema ou derrame articular.
6. Serosite	Pleuris (caracterizada por história convincente de dor pleurítica, atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural) ou pericardite (documentado por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico).
7. Comprometimento renal	Proteinúria persistente ( $> 0,5$ g/dia ou 3+) ou cilindúria anormal.
8. Alterações neurológicas	Convulsão (na ausência de outra causa) ou psicose (na ausência de outra causa).
9. Alterações hematológicas	Anemia hemolítica ou leucopenia (menor que $4.000/\text{mm}^3$ em duas ou mais ocasiões), linfopenia (menor que $1.500/\text{mm}^3$ em duas ou mais ocasiões) ou plaquetopenia (menor que $100.000/\text{mm}^3$ na ausência de outra causa).
10. Alterações imunológicas	Anticorpo anti-DNA nativo ou anti-Sm ou presença de anticorpo antifosfolípide com base em: a) níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina; b) teste positivo para anticoagulante lúpico; ou c) teste falso-positivo para sífilis, por, no mínimo, seis meses.
11. Anticorpos antinucleares	Título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência indireta ou método equivalente, em qualquer época, e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas à síndrome do lúpus induzido por drogas.

A ferramenta mais amplamente utilizada para avaliar a atividade e a gravidade da doença é o SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*). Este índice foi desenvolvido pela Universidade de Toronto em 1986 e consiste de 24 itens, dos quais 16 estão relacionados a parâmetros clínicos e 8 a parâmetros laboratoriais. Cada item possui uma nota que varia de 1 a 8 de acordo com a sua gravidade. A somatória das notas resulta em um score final que representa o grau de

atividade/gravidade apresentada pelo indivíduo com LES. O score do SLEDAI varia de 0 a 105, onde quanto maior o score, maior é a atividade da doença. O SLEDAI classifica 4 graus de atividade da doença: 1-5: atividade discreta; 6-10: atividade moderada; 11-19: atividade intensa;  $\geq 20$ : atividade muito intensa (CASTREJÓN et al., 2014).

Manifestações clínicas como inflamação na pele, articulações, rins, nervos, cérebro, pleura e pericárdio podem ocorrer no LES, contudo algumas manifestações são mais comuns que outras. Manifestações cutâneas podem ocorrer em torno de 80% dos indivíduos afetados, sendo o Rash Malar a alteração mais comumente observada (Figura 4a). Lesões discoides podem surgir frequentemente associadas à exposição à luz UV, devido à radiação solar. A exposição à radiação UV também está associada à fotossensibilidade no LES, caracterizada por sensibilidade desproporcional nesses indivíduos, onde mesmo uma pequena exposição pode provocar manchas na pele e até mesmo febre. A alopecia é muito frequente e ocorre nas fases de atividade da doença e na maioria das pessoas o cabelo volta a crescer normalmente com o tratamento (Figura 4b) (SATO et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2003).



**Figura 4** - Características clínicas nos pacientes com LES. a) rash malar b) alopecia. Fonte: <http://www.portalped.com.br/blog/especialidades-da-pediatria/reumatologia/lupus-eritematoso-em-pediatria-novos-criterios-diagnosticos-e-tratamento-inicial/> <Acesso em: 21/01//2018>.

Dores e inchaço articulares são comumente relatados em indivíduos com LES, ocorrendo em cerca de 90% destes indivíduos e envolve principalmente as mãos, punhos, joelhos e pés. A artrite pode surgir como uma característica inerente aos danos articulares no LES, em alguns casos pode ocorrer até mesmo tendinites (MAGALHÃES JUNIOR, 2013).

A inflamação das membranas que recobrem o pulmão (pleurite) e coração (pericardite) são relativamente comuns, podendo ser leves e assintomáticas, ou, se manifestar como dor no peito. No caso da pleurite, a dor ocorre ao respirar, podendo causar também tosse seca e falta de ar. Na pericardite, além da dor no peito, pode haver palpitações e falta de ar (MAGALHÃES JUNIOR, 2013).

A nefrite é uma das manifestações que mais preocupantes no paciente com LES e ocorre em cerca de 50% dos indivíduos afetados pela doença. No início pode não haver qualquer sintoma, apenas alterações nos exames de sangue e/ou urina. Nas formas mais graves, surge pressão alta, inchaço nas pernas, a urina fica espumosa, podendo haver diminuição da quantidade de urina diante a inflamação nos rins. A nefrite lúpica é diagnosticada através de microscopia óptica e biopsia renal e é dividida em seis subtipos histológicos: as classes I e II são consideradas de menor severidade; a classe III (proliferativa focal), IV (proliferativa difusa) e a V (membranosa) que apresentam potencial para provocar danos permanentes nos rins; e, por fim, a classe VI (nefrite esclerosante avançada) onde já há dano renal (WEENING et al., 2004). Quando não tratada rápida e adequadamente o rim deixa de funcionar (insuficiência renal) e o paciente pode precisar fazer diálise ou transplante renal (SATO et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2003; MAGALHÃES JUNIOR, 2013).

Algumas alterações são menos frequentes no LES, distúrbios neuropsiquiátricos podem ocorrer no LES, porém com menor frequência, podendo causar convulsões, alterações de humor ou comportamento (psicoses), depressão e alterações dos nervos periféricos e da medula espinhal. (MAGALHÃES JUNIOR, 2013). Alterações nas células sanguíneas ocorrem devido a presença de anticorpos contra as mesmas, podendo ocorrer anemias, leucopenia e plaquetopenia, em grande parte assintomáticas (MAGALHÃES JUNIOR, 2013).

## 2.5 TRATAMENTO DO LES

De acordo com as manifestações clínicas apresentadas pelo paciente, o médico avaliará a conduta médica mais adequada (MAGALHÃES et al., 2003). A atividade ou remissão da doença será um dos principais critérios de avaliação. Por se tratar de uma doença sistêmica que afeta diversos órgãos, são utilizados medicamentos que modulam as alterações imunológicas ou danos a órgãos e sistemas que a pessoa apresente em consequência da inflamação causada pelo LES, como hipertensão, artrite, inchaço, ulcerações, etc. Os fármacos que atuam na modulação do sistema imunológico no LES incluem corticoides, antimaláricos e imunossupressores, em especial a azatioprina, ciclofosfamida e micofenolato de mofetil. Para as lesões na pele comumente são usados corticosteroides (SATO et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2003).

Vilá e colaboradores (1999) observaram que a utilização de protetor solar e/ou roupas com proteção UV por pacientes com LES é de grande importância, tendo em vista a fotossensibilidade apresentada por estes indivíduos. O estudo identificou ainda que indivíduos que fazem uso de protetores solares apresentaram menor comprometimento renal, menor trombocitopenia e menor índice de hospitalização do que aqueles que não utilizavam. Quando a doença está em atividade, as doses dos corticoides como a prednisona são aumentadas. Em pacientes com LES em atividade e com rápida evolução, pode-se utilizar glicocorticóide. Já quando ocorre a remissão da doença ocorre a utilização da cloroquina (ou hidroxicloroquina), e em diversos casos o uso deste medicamento costuma estender-se por toda a vida do paciente (SATO et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2003).

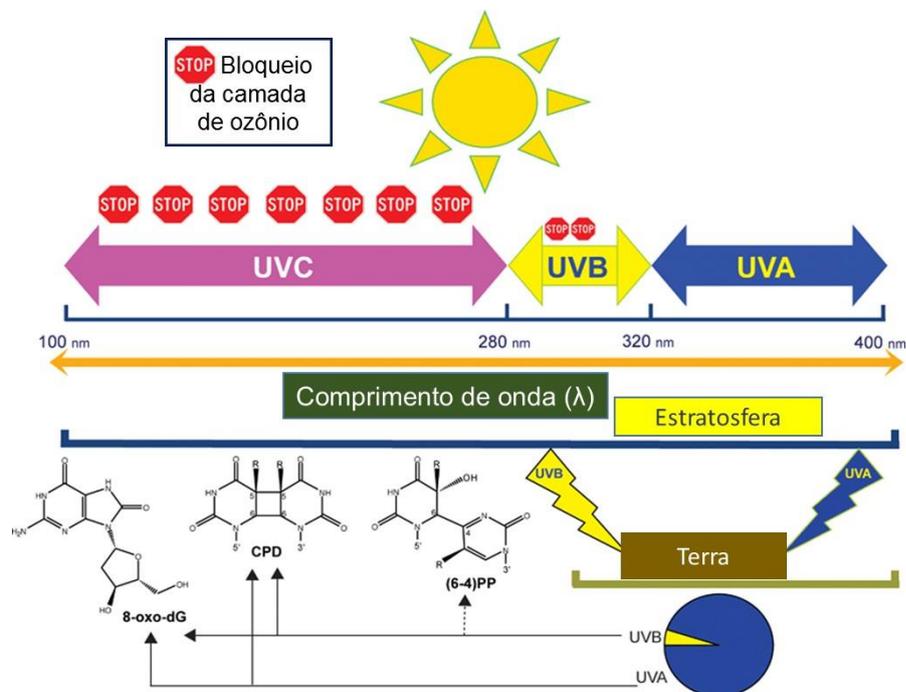
## 2.6 INFLUÊNCIA AMBIENTAL NO LES

### 2.6.1 Radiação Ultravioleta

Radiações não-ionizantes são radiações eletromagnéticas de frequência igual ou menor que a da luz visível, ou seja, abaixo de  $8 \times 10^{14}$  Hz (luz violeta), que não

carrega energia suficiente por quantum (energia dos fótons) para ionizar átomos ou moléculas (HECHT, 2000; PODGORSKAK, 2010). Apesar das radiações não-ionizantes possuírem energia relativamente baixa e de não alterarem o átomo, alguns tipos podem causar alterações celulares. A Radiação ultravioleta (UV) é um tipo de radiação não-ionizante presente na luz Solar que possui mecanismos de ação que influenciam diretamente a biologia celular (HARM, 1980; GARINIS et al., 2006). A radiação UVC é totalmente bloqueada pela camada de ozônio, a UVB tem parte de sua emissão bloqueada e a UVA é totalmente liberada na superfície terrestre (Figura 5) (DOUKI et al., 2003).

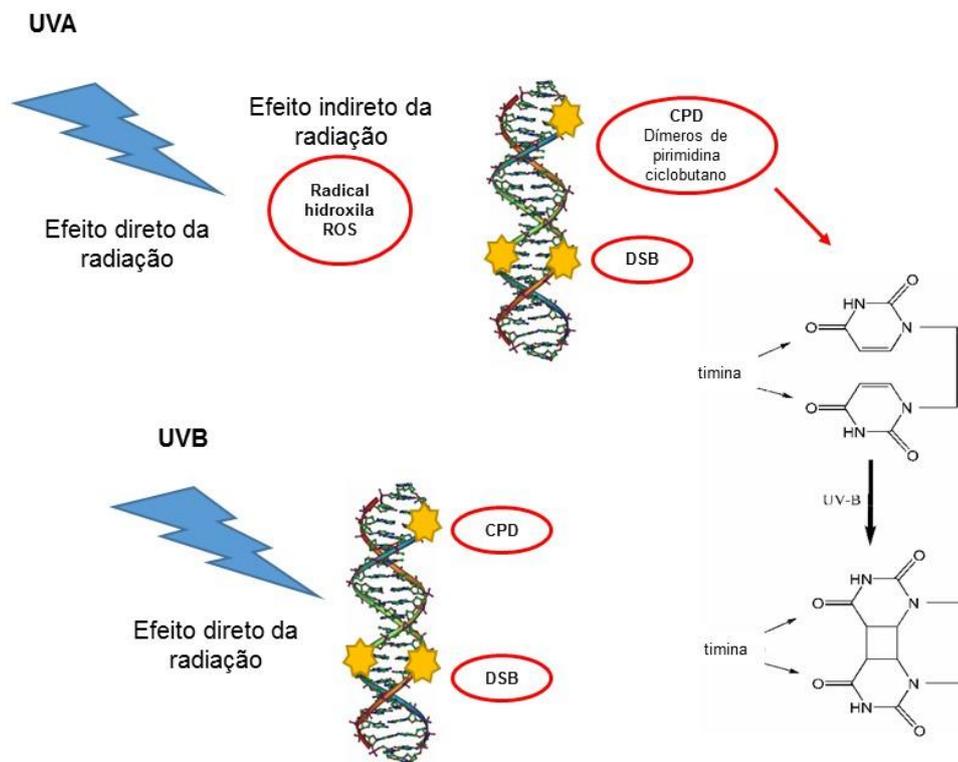
Ao atingir a pele a Radiação UV pode provocar diversas reações químicas e morfológicas no organismo, produzindo alterações de melanina, DNA, RNA, proteínas, aminoácidos aromáticos, como a tirosina e o triptofano, ácido urocânico, entre outros. Além disso, apresenta ação cumulativa onde pode ocorrer formação de ROS, alterações histoquímicas de diferentes gravidades, espessamento da camada espinhosa e retificação da junção dermoepidérmica. Diversas moléculas na pele podem absorver a radiação UV e sofrer alterações químicas devido a essa absorção (BASHIR et al, 1993; COOKE et al., 1997).



**Figura 5** - Emissão após bloqueio da camada de ozônio na superfície da terra e comprimento de ondas das radiações UVA, UVB e UVC. Modificado de PFEIFER & BESARATINIA, 2012.

O DNA é uma das principais moléculas afetadas pela radiação UV e, portanto, pode sofrer mutações que, posteriormente, podem resultar em transformações malignas da célula. A radiação UV pode ativar componentes do sistema imune cutâneo, gerando resposta inflamatória por distintos mecanismos, tais como: ativação direta de queratinócitos e outras células que liberam mediadores inflamatórios e redistribuição e liberação de autoantígenos sequestrados de células danificadas pela radiação UV (WISCHERMANN et al., 2008).

As pirimidinas sofrem modificações fotoquímicas, resultando em dímeros de pirimidina-ciclobutano (CPD) e demais subprodutos que são reparados, fisiologicamente, por proteínas específicas. Porém, quando este sistema de reparo se encontra defeituoso, esses dímeros de timina que se formam não são reparados (Figura 6). A ABC excinuclease, DNA polimerase I e DNA ligase são exemplos de enzimas que participam do sistema de reparo do DNA (DOUKI et al., 2003).



**Figura 6** - Efeitos das radiações UVA e UVB na molécula de DNA. Os principais efeitos da ação da radiação UV são dímeros de pirimidina ciclobutano e DSB, que podem surgir indiretamente através da ação de ROS.

As DSBs, por sua vez, podem ser produto da ação direta e indireta da irradiação UV, e tais danos quando não reparados aumentam a imunogenicidade da molécula de DNA, podendo levar a autoimunidade através do aumento do número de corpos apoptóticos circulantes (COOKE et al., 1997). Tais alterações são mecanismos chave na patogênese do LES (BASSI et al., 2008). Observa-se que o aumento de ROS produzidos em sítio de injúria ao interagirem com o DNA podem promover as DSBs através do efeito indireto da irradiação UV (BASHIR et al., 1993).

Os ROS promovem resposta inflamatória e autoimunidade no LES, sendo um dos pilares que conduzem à formação de anticorpos anti-DNA. A exposição ao ROS aumenta a antigenicidade do DNA, contudo os estudos sobre imunogenicidade de ROS-DNA-LES não são conclusivos (BASSI et al., 2008; TOCHHAWNG et al., 2013). Um estudo realizado por Cooke e colaboradores (1997) investigou a imunogenicidade de irradiações UVA, UVB e UVC em DNA lúpico através da detecção de anticorpos anti-DNA. Os autores observaram que modificações no do DNA poderiam ser geradas tanto por ROS quanto por UV, aumentando dramaticamente a sua imunogenicidade. Os dados sugeriram que diferentes perfis de antigenicidade e a imunogenicidade surgem na dependência do método de produção de ROS, mas também que as ROS-DNA podem ser um fator na formação do complexo imunológico dirigido para o antígeno no LES.

No LES a produção do radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) é aumentada em células inflamatórias tais como leucócitos polimorfonucleares. Em consequência observa-se o aumento da incidência de aberrações cromossômicas possivelmente resultantes de danos induzidos ao DNA. O aumento do estresse oxidativo no DNA, pode ser resultado da inflamação ativa no LES que resultaria no aumento da formação de radicais livres nos locais da inflamação (BASHIR et al., 1993).

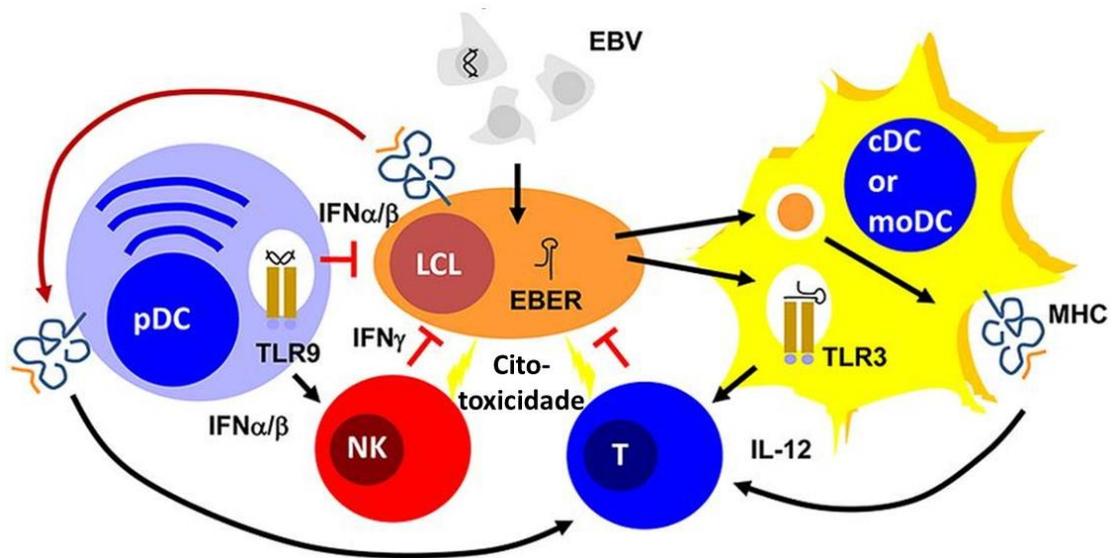
Os ROS podem desencadear a ativação de vias de sinalização envolvidos na migração celular tais como os membros da família das proteínas quinases ativadas por mitógeno / reguladas por quinase extracelular (MAPK/ERK), c-Jun NH-2 terminal de quinase (JNK) e MAPK/p38 (TOCHHAWNG et al., 2013).

### 2.6.2 Vírus Epstein Barr

Os fatores etiopatológicos do LES ainda permanecem desconhecidos, no entanto a infecção viral tem sido largamente estudada como um dos fatores desencadeantes da doença. Os vírus desempenham um papel importante nas doenças autoimunes e entre os agentes infecciosos envolvidos com a patogênese do LES, os mais importantes são o parvovírus B19 (B19), o vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV), o citomegalovírus humano (HCMV) e o vírus Epstein-Barr (EBV) (HARLEY & JAMES, 2006; KOSMINSKY et al., 2006; BRASIL-COSTA et al., 2016).

O EBV pertencente à família Herpesviridae, é um vírus da família herpes, compreende um genoma de dsDNA linear de 172 kb dentro de uma cápside icosaédrica, fechada por um envelope com glicoproteínas virais (gp350) e representa um dos vírus mais comuns em humanos (FARRELL, 2001; DRABORG et al., 2012). O EBV é amplamente conhecido como agente etiológico da mononucleose infecciosa e apresenta ampla distribuição mundial, estima-se que aproximadamente 90% da população esteja infectada. Os mecanismos etiopatológicos do EBV no LES ainda são pouco conhecidos, o que se sabe é que o mimetismo molecular do vírus diante de auto-antígenos induziria a produção de auto-anticorpos. Auto-anticorpos dirigidos contra anti-Sm e anti-RNP, são encontrados no soro de cerca de 30% a 50% dos pacientes lúpicos (KOSMINSKY et al., 2006).

Além disso, o EBV codifica pequenos RNAs chamados EBER (*Epstein-Barr virus-encoded small RNA*) que dão origem a dsRNAs (*double-strand RNA*) encontrados abundantemente em células infectadas por EBV. O EBER induz a sinalização do receptor Toll-like 3 (TLR3), que ao detectar o dsRNA induz a produção de IFN do tipo I e de citocinas pró-inflamatórias. O EBER induz, portanto, a ativação da imunidade inata (Figura 7) (IWAKIRI et al., 2009).



**Figura 7** - O vírus Epstein Barr codifica pequenos RNAs chamados EBER que induzem a sinalização de TLR3 e TLR9 ativando as células T e NK através da secreção de IL-12 e interferon do tipo I ( $IFN\alpha/\beta$ ), respectivamente. Modificado de MÜNZ, 2014.

O ciclo viral, no interior do hospedeiro, inclui um período de latência, que pode durar anos, e outro de replicação que pode emergir em quantidade suficiente para causar estimulação do sistema imune. Por conta disso a infecção por EBV tem sido associada ao LES tanto na fase de remissão como na fase ativa da doença, embora a carga viral seja maior na fase ativa (PIROOZMAND et al., 2017). A associação de fatores ambientais em conjunto com fatores genéticos, além de estudos que demonstram respostas sorológicas específicas, expressão gênica diferenciada, análise de carga viral, respostas específicas de células T, especificidade humoral e mimetismo molecular demonstram o papel crucial do EBV na etiologia e patogênese do LES (JAMES & ROBERTSON, 2012).

## 2.7 GENÉTICA DO LES

Durante vários anos, estudos verificaram que certos componentes na família dos genes do Complexo de Histocompatibilidade Humana - HLA estavam associados a ao desenvolvimento lúpus. Estes foram os primeiros genes estudados no LES e até hoje se identifica associação de genes codificados por este complexo com aumento de antigenicidade no LES (WUSTER & BEHRENS, 2016).

Os fatores genéticos conferem predisposição ao desenvolvimento do LES e, na maioria dos pacientes, a doença é resultado de um efeito combinado de polimorfismos em um grande número de genes, sendo que cada alelo contribui minimamente, e o efeito cumulativo de vários polimorfismos genéticos é necessário para aumentar de forma significativa o risco à doença. A maioria dos polimorfismos de base única (SNPs) associados ao LES está em regiões não codificadoras do DNA de genes relacionados à resposta imune (TSOKOS, 2011).

As principais estratégias usadas até o momento na busca de marcadores genéticos do LES são os estudos de associação genômica em larga escala (GWAS) e os estudos de associação genética, normalmente realizados em estudos do tipo caso-controle. Qualquer uma das estratégias acima apresenta limitações para o estabelecimento do risco genético, e estudos posteriores em diferentes populações são necessários para se confirmar os resultados obtidos (SESTAK et al., 2008).

## 2.8 GENES DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA NO LES

A imunidade inata atua como primeira linha de defesa no organismo, e mantém uma ligação intrínseca com a imunidade adaptativa, podendo inclusive otimizá-la (WEIDENBUSCH et al., 2017).

Alterações na imunidade inata desempenham um papel importante na patogênese do LES, contribuindo tanto para o dano tecidual, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como induzindo a formação de auto-antígenos. Esses auto-antígenos são reconhecidos por células dendríticas através do DNA de CpG (*cytosine-phosphate-guanine*), através de DNA existente nos imunocomplexos e pelo

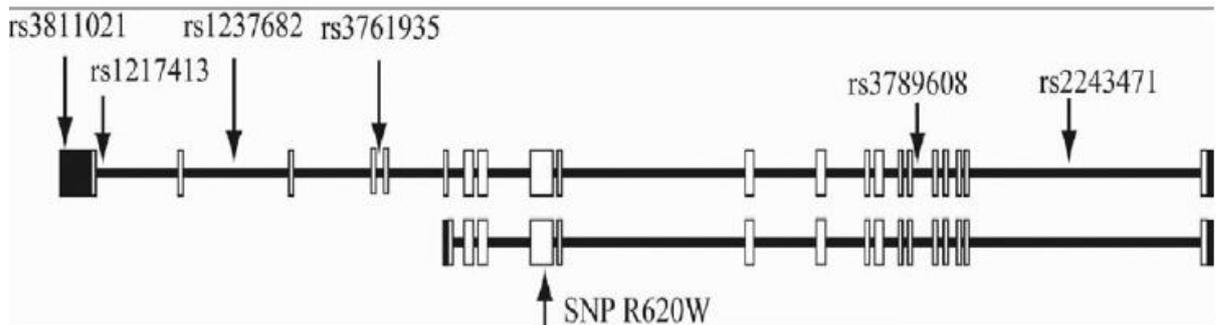
RNA nos antígenos próprios e, com isso, regulam respostas autoimunes adaptativas, através da ativação anormal de linfócitos T e B autorreativos (HAHN, 2012).

Diversos genes envolvidos na regulação dos mecanismos da imunidade inata e adaptativa vem sendo estudados em doenças autoimunes. Os principais genes envolvidos com respostas inata e adaptativa estudados no LES se relacionam com a ativação da via do IFN1 e com a regulação de células T e B (HARLEY, 2009; BURN et al., 2011; STANFORD et al., 2012).

### 2.8.1 Gene PTPN22

O gene que codifica a proteína tirosina fosfatase não-receptora tipo 22 (PTPN22) já foi associado a diversas doenças autoimunes, incluindo artrite reumatóide, diabetes tipo 1, doença tireoidiana autoimune e o LES (CHUNG & CRISWELL, 2007; BURN et al, 2011). O gene PTPN22 está localizado na região cromossômica 1p13.3-13.1 e codifica a fosfatase específica linfóide citoplasmática (LYP), que atua inibindo a ativação das células T e está envolvida na regulação da sinalização do seu receptor, o TCR (receptor de célula T) (WU et al., 2006). A isoforma predominante desta fosfatase é uma proteína de 105 kDa e seus últimos 200 aminoácidos codificam 4 sequências “*motifs*” ricas em prolina (P1-P4), onde P1 liga-se ao domínio SH3 da tirosina quinase Csk, que irá regular negativamente a sinalização do TCR (CHUNG & CRISWELL, 2007).

O gene PTPN22 possui um polimorfismo “*missense*” de base única (SNP rs2476601) na posição 1858 (C>T), que provoca a substituição de um aminoácido arginina no códon 620 (CGG) por um triptofano (TGG) da proteína Lyp (variante W620) (Figura 8) associado a doenças autoimunes. Essa substituição altera a função catalítica da proteína, o que pode afetar a resposta efetiva do sistema imunológico (FOUSTERI et al., 2013). Esta variante codifica uma enzima que promove ganho de função, e com isso há um aumento da inibição da sinalização do receptor TCR da célula T. Essa inibição pode afetar a deleção tímica das células T autorreativas ou o desenvolvimento e função das células T reguladoras periféricas (VANG et al., 2007; GIANCACCCHI et al., 2013).



**Figura 8** - Estrutura do gene PTPN22 em duas isoformas transcritas e seis SNPs. O SNP R620W (rs2476601) C1858T provoca a substituição de um aminoácido arginina no códon 620 (CGG) por um triptofano (TGG) da proteína Lyp. Modificado de PRADHAN et al., 2010.

O polimorfismo 1858 C>T do PTPN22 tem uma distribuição mundial variável e já foi estudado em várias populações como asiática, americana, européia e latina, além disso, também já foi associado a múltiplas doenças autoimunes. Este polimorfismo apresenta associação tanto à susceptibilidade ao desenvolvimento de LES quanto à proteção em relação à doença, a depender da população do estudo (AKSOY et al., 2011; OSTANEK et al., 2014). Tais resultados conflitantes em estudos de associação suscitam a necessidade da realização de meta-análises para avaliar essa associação tanto a nível global quanto através de classificação por etnias (LEA & LEE, 2011; SHI et al., 2013).

### 2.8.2 Gene IFIH1

A família de citocinas do IFN vem sendo amplamente estudada devido suas propriedades antivirais. Os IFNs são classificados com base na sequência de aminoácidos e no reconhecimento de receptores específicos em três famílias: O IFN de Tipo I inclui IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$  e IFN- $\omega$ ; o IFN de Tipo II consiste em um único membro, IFN- $\gamma$ ; e o IFN de tipo III, IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A) e IFN- $\lambda$ 3 (IL-

28B). A família de citocinas do Interferon do tipo I desempenham um papel central na patogênese de LES, promovendo progressivamente a tolerância imune periférica e conduzindo a uma maior atividade da doença. (OBERMOSER & PASCUAL, 2010).

Estudos demonstraram considerável aumento dos níveis de o IFN- $\alpha$  no soro de indivíduos lúpicos, principalmente durante a atividade da doença. Além disso, os transcritos de genes regulados por IFN- $\alpha$  mostraram-se significativamente aumentados no sangue venoso periférico de pacientes de LES. Conseqüentemente, o IFN- $\alpha$  é considerado um alvo terapêutico e a sua presença, descrita como “assinatura de IFN”, vem sendo avaliada como biomarcador para a atividade da doença (ELKON & STONE, 2011).

Os vírus representam uma interação gene-ambiente capaz de estimular alguns dos primeiros eventos em pacientes com LES, uma vez que dados epidemiológicos associam a infecção do vírus Epstein Barr na patogênese inicial da doença (JAMES et al., 1997; POOLE et al., 2006). A desregulação da via das helicases antivirais representa um fator patogênico primário no LES. Um sistema de helicases antivirais hipersensíveis ou hiperativas, associado a um gatilho viral, como a infecção por vírus Epstein-Barr, pode resultar em uma resposta IFN do tipo I exagerada e posterior indução da resposta imune adaptativa contra auto-antígenos (OLIVEIRA et al., 2014).

Os estudos buscando a compreensão das bases moleculares da imunidade inata, e a elucidação do sistema TLR (toll like receptors) levaram à identificação do papel do IFN- $\alpha$  na patogênese do LES (CROW, 2014). Os TLRs são receptores transmembranares expressos em células imunes específicas, como células dendríticas e macrófagos. TLR7, 8 e 9 são expressos na membrana endossomal e podem reconhecer o ácido nucleico viral. Por sua vez, RLRs (RIG-I-like receptors), são proteínas citossólicas que podem reconhecer o ácido nucleico viral no citosol. Os TLR localizados nos endossomas ativam principalmente as células apresentadoras de antígenos, enquanto que os sensores de ácido nucleico citoplasmáticos são projetados para reconhecer RNA intermediários de replicação viral em células infectadas. A família de receptores RIG-I, composta por RIG-I, MDA5 e LGP2, está localizada no citosol das células em todo o corpo e reconhece os produtos derivados de pequenos RNAs. RNAs de cadeia dupla (dsRNA) são conhecidos por representar

um intermediário molecular durante a replicação de muitos vírus dentro de células infectadas (OLIVEIRA et al., 2014; SAEED, 2017).

O gene *IFIH1* (*interferon induced with helicase C domain 1*), localizado no cromossomo 2 (2q24) (Figura 9), codifica uma proteína homônima, também conhecida como MDA5 (melanoma differentiation associated gene 5) capaz de reconhecer o dsRNA viral no citoplasma das células infectadas modulando a resposta de IFN de tipo 1, a produção de citocinas pró-inflamatórias e processos apoptóticos (CHISTIAKOV, 2010; OLIVEIRA et al., 2014). Estudos de associação genética confirmaram que o gene *IFIH1* estaria envolvido na via da patogênese de distúrbios autoimunes, como diabetes tipo 1 (T1D) e doença de Graves (SMYTH et al., 2006; SUTHERLAND et al. 2007; GATEVA et al., 2009).



**Figura 9** - Representação esquemática do gene *IFIH1*. O SNP C>T rs1990760 (Ala946Thr) do *IFIH1* apresenta-se associado ao LES em estudos conduzidos em diversas populações. Fonte: BOUÇAS et al., 2013.

Um estudo de Crampton e colaboradores (2012) revelou que níveis elevados de *IFIH1* em camundongos lúpicos poderiam acelerar processos autoimunes e exacerbar a doença aumentando os níveis de autoanticorpos antinucleares (CRAMPTON et al., 2012). Além disso, os níveis aumentados de *IFIH1* em regiões específicas de tecido de pacientes com Lúpus Eritematoso Discóide Crônico sugerem um papel fundamental desta proteína na predisposição ao LES (ZAHN et al., 2011).

O polimorfismo C>T rs1990760 (Ala946Thr) do *IFIH1* apresenta-se associado ao LES em estudos conduzidos em diversas populações como a Européia, Japonesa, Chinesa e Americana (SLEGEN et al., 2008; GONO et al., 2010; CEN et al., 2012;

MOLINEROS et al., 2013). Tais estudos identificaram que o alelo T está associado a uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento da doença, tendo em vista que o aumento na expressão desse gene pode levar ao aumento dos níveis de IFN- $\alpha$  e conseqüentemente desordens autoimunes. Contudo outros estudos apresentam resultados contraditórios demonstrando a necessidade de mais estudos de associação e da elaboração de meta-análises para melhor elucidar o papel desse polimorfismo no LES (GATEVA et al., 2009; ENEVOLD et al., 2014). Robinson e colaboradores (2011) observaram que a presença do alelo T do rs1990760 está associada ao aumento de IFN- $\alpha$  no soro de pacientes lúpicos, devido ao aumento da expressão do *IFIH1*, promovendo autoimunidade.

### 2.8.3 Gene VDR

A vitamina D ou colecalciferol, é um hormônio esteroide que vem sendo descrito na literatura como um potente hormônio imunossupressor, interferindo nas funções e na modulação da célula T regulatória (Th) (KAMEN et al., 2010). A relação entre a deficiência de vitamina D com várias doenças inflamatórias já foi descrita, incluindo diabetes Mellitos tipo II, esclerose múltipla, doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide, bem como o LES (CANTORNA, 2000).

A principal fonte de vitamina D para o ser humano é a radiação ultravioleta do tipo B, proveniente da exposição à radiação solar, contudo a dieta também tem participação significativa, cerca de 20%, desta aquisição. Quando somos expostos à radiação UVB um precursor da vitamina D presente na pele, o 7-desidrocolesterol, sofre uma clivagem fotoquímica originando a pré-vitamina D3 que sofre um rearranjo molecular que resulta na formação da vitamina D3 (colecalciferol). A vitamina D circula no sangue ligada a uma proteína ligadora de vitamina D, contudo uma pequena fração se liga à albumina. Quando chega ao fígado a vitamina D, sofre hidroxilação, mediada por uma enzima chamada citocromo P450-like, e é convertida em 25-hidroxivitamina D [25(OH)D]. A etapa final da produção deste hormônio é uma hidroxilação que ocorre nas células do túbulo contorcido proximal no rim, dando origem a 1,25

desidroxivitamina D [1,25(OH)2D3], sua forma biologicamente ativa (MARQUES et al., 2010).

A função primária da vitamina D (D3) está relacionada à homeostase do cálcio e ao metabolismo ósseo. Além disso, tem sido relatada como reguladora pleiotrópica da fisiologia humana e como moduladora do sistema imune inato e adaptativo (DI ROSA et al., 2011; VELDURTHY et al., 2016). A vitamina D interage com o sistema imunológico através da regulação e da diferenciação de células como linfócitos, macrófagos e células NK, além de interferir na produção de diversas citocinas, como por exemplo, a diminuição da produção de IL-2, INF $\gamma$  e TNF. Além disso, a vitamina D promove a inibição da expressão de IL-6 e inibição da produção e secreção de autoanticorpos pelos linfócitos B (SZODORAY et al., 2008). Estudos *in vitro* demonstraram que a vitamina D inibe a síntese de IL-17, inibindo a diferenciação Th17 e aumenta a quantidade de células reguladoras CD4 + CD25 + T, que produzem IL-10 e amplificam o interruptor Th1-Tr1 (HAYES et al., 2015).

A vitamina D exerce suas ações através da interação com seu receptor específico chamado VDR, presente em vários órgãos, tecidos e em todas as células do sistema imune (WANG et al., 2012). O VDR está localizado no cromossomo 12 (12q13.11) e exibe vários polimorfismos que podem modular os níveis e a atividade do receptor (DE AZEVÊDO SILVA et al., 2012). Trata-se de um fator de transcrição nuclear que em conjunto com a vitamina D, 1,25 (OH) 2D3 ativa, regula a expressão de mais de 900 genes envolvidos em uma ampla gama de funções fisiológicas. A participação do gene VDR na função imune tem sido o foco de estudos de susceptibilidade a várias doenças autoimunes, assim como no LES (KONGSBAK et al., 2013).

As células T e B expressam VDR e são células alvo importantes da regulação imune pelo calcitriol. A vitamina D pode suprimir a imunidade celular e humoral em vários modelos animais, pois desempenha um papel importante na regulação da proliferação, diferenciação de células B ativadas e produção de imunoglobulinas (ROLF et al., 2014).

A expressão e a atividade do VDR desempenham um papel fundamental no desenvolvimento, diferenciação de células T e sua função efetora. As células T são, por sua vez, de grande importância tanto para o desenvolvimento quanto para a

progressão de doenças inflamatórias. A principal ação da 1,25 (OH) 2D3 ativa que atua em conjunto com o VDR em linfócitos é inibir sua proliferação, diferenciação e até mesmo a maturidade celular, esse efeito anti-proliferativo é mais profundo nas classes de células auxiliares que supressoras, levando à inibição generalizada da resposta imune adaptativa (KONGSBAK et al., 2013).

Por sua vez, um estudo realizado por Chen e colaboradores (2007) sugere que a vitamina D modifica a atividade das células B induzindo apoptose precoce em células B ativas. Portanto, o aumento da atividade nos pacientes com LES com níveis inadequados de vitamina D ocorreria devido a uma menor quantidade de células B apoptóticas e, por consequência, o aumento na produção de auto-anticorpos. Além disso, a vitamina D induz a sua própria degradação por ativação e aumento da expressão da 24-hidroxilase. A regulação desta enzima em células B ativadas pode ser a possível causa de deficiência de vitamina D em indivíduos lúpicos devido a diminuição da absorção de luz solar e doença renal induzida pela própria doença (CHEN et al., 2007).

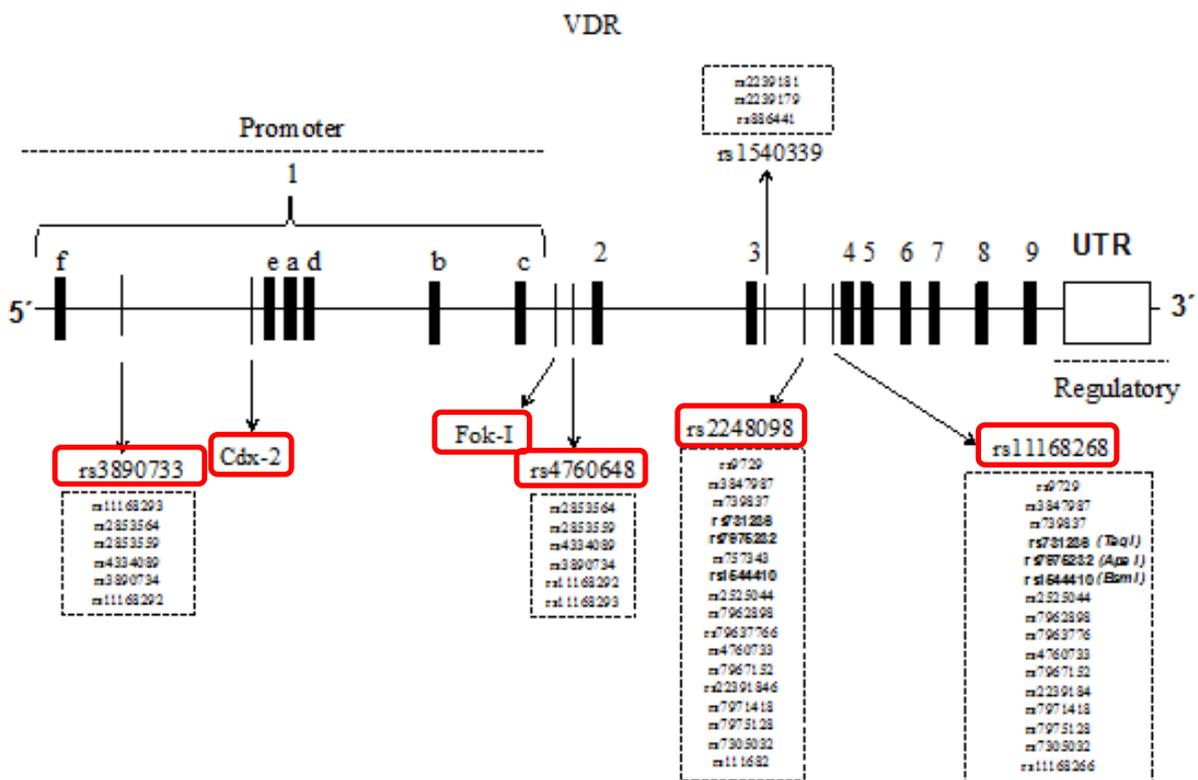
O gene VDR está localizado no cromossomo 12 (12q13.1), e tem comprimento de mais de 100kb, apresentando oito éxons codificadores de proteínas (éxons 2-9), seis éxons não traduzidos (1a-1f), oito íntrons e duas regiões promotoras (NEJENTSEV et al., 2004). Os SNPs descritos no VDR encontram-se principalmente nas regiões promotoras e na região 3'UTR. Os polimorfismos Cdx2 (rs11574010), FokI (rs2228570), BsmI (rs1544410), ApaI (rs7975232) e TaqI (rs731236) são amplamente descritos na literatura (UITTERLINDEN et al., 2004; MORAND et al., 2014).

O polimorfismo Cdx2 (G>A), ocorre na região promotora do gene VDR, e a presença do alelo A interfere na ligação do fator de transcrição, aumentando a atividade transcricional do gene e consequentemente sua expressão. O polimorfismo Fok1 (C>T) ocorre na junção do intron 1 com o exon 2, gerando um códon de início adicional. Este polimorfismo influencia diretamente na funcionalidade da proteína e interfere em processos imunorregulatórios, pois regula fatores de transcrição imuno-específicos, proliferação de linfócitos e síntese de proteínas do sistema imune. Já os polimorfismos Bsm1 (A>G), Apa1 (T>G) e Taq1 (C>T) são descritos como SNPs

que apresentam elevado desequilíbrio de ligação, porém sua relevância funcional ainda é pouco conhecida (MONTICIELO, 2011).

De Azevêdo Silva e colaboradores (2013) avaliaram a possível associação de cinco TagSNPs do gene VDR que apresentam elevado desequilíbrio de ligação e o LES, bem como suas manifestações clínicas, em uma população do Sudeste do Brasil. Neste estudo os autores descreveram associação do rs11168268 com alterações cutâneas, do rs3890733 com artrite, do rs2248098 com alterações imunológicas e do rs4760648 com a presença do anticorpo anti-dsDNA.

Os principais polimorfismos do gene VDR estudados e alguns de seus TagSNPs estão descritos na figura 10.



**Figura 10** - Estrutura do gene VDR. As posições dos SNPs rs11168268, rs2248098, rs4760648, rs3890733, Cdx-2 e Fok-I estão destacadas e as caixas pontilhadas indicam os respectivos TagSNPs. Modificado de DE AZEVÊDO SILVA et al., 2013.

Nos últimos anos algumas meta-análises foram realizadas com intuito de avaliar a associação de polimorfismos do gene VDR (BsmI, FokI, ApaI ou TaqI) com

risco de SLE. Contudo, tais pesquisas chegaram à conclusão que estudos de associação como estes devem ser feitos em diferentes populações para que os resultados sejam mais conclusivos, tendo em vista que a função do gene VDR pode sofrer influências ambientais, étnicas, epigenéticas, entre outras, que podem influenciar nos resultados dos ensaios de associação ao risco de desenvolvimento do LES e suas manifestações clínicas (MAO et al., 2014; ZHOU et al., 2014; HU et al., 2016).

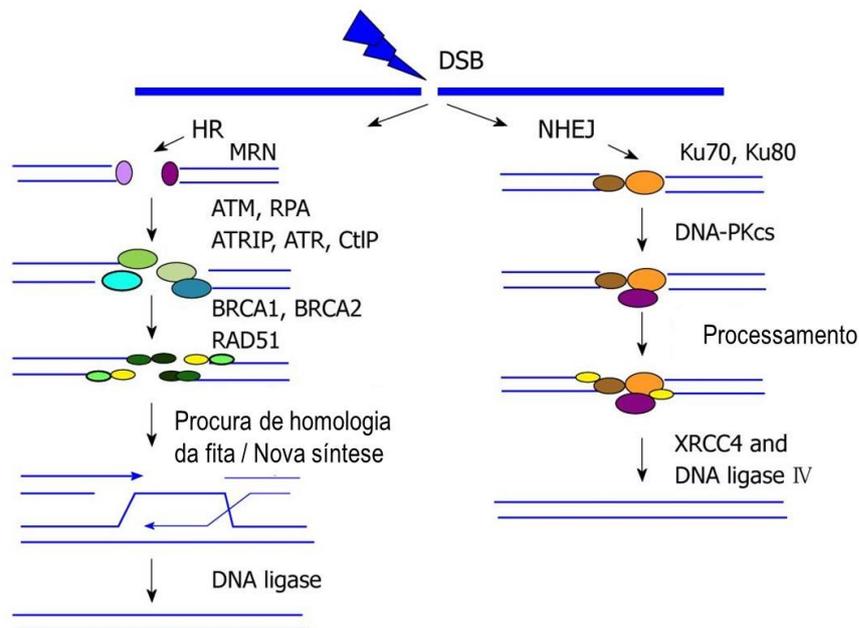
## 2.9 GENES DE REPARO DE DNA NO LES

As células humanas acumulam cerca de 10.000 quebras no DNA todos os dias, sendo o reparo do DNA essencial para a manutenção da estabilidade genômica. A falha em reparar essas quebras pode levar a mutações, instabilidade genômica ou apoptose. Dentre os vários tipos de danos que podem ser expressos nas células, as quebras na dupla fita do DNA (DSBs) são as mais perigosas. DSBs são lesões que podem ser induzidas por eventos endógenos como radicais  $O_2$  livres e a replicação do DNA, ou exógenos como a ação de agentes genotóxicos, radiação ionizante, ou mesmo estresse ambiental. As células danificadas podem seguir por duas vias de reparo de DSBs: recombinação homóloga (HR) e das extremidades não homólogas (NHEJ) (TSAI & LIEBER, 2010; NEAL & MEEK, 2011). Observa-se que pacientes com LES apresentam deficiência no reparo de DSBs em relação a indivíduos saudáveis, além disso, algumas enzimas de reparo da via NHEJ já foram associadas ao LES e a suas manifestações clínicas (BASSI et al., 2008).

Sandrin-Garcia e colaboradores (2009) avaliaram o perfil de expressão gênica de 4500 genes comparando pacientes com LES nas fases ativa e de remissão da doença em relação a indivíduos saudáveis. Um total de 156 genes mostrou-se diferencialmente expresso quando comparados os pacientes e controles. Desses 156 genes, um total de 8 genes apresentaram expressão diferencial nas fases ativa e inativa do LES, dentre os quais o *LIG4* e o *STK17A* apresentaram repressão de 21 e 154 vezes, respectivamente, e o *RAD52* apresentou indução de cerca de 169 vezes, todos na fase ativa a doença.

### 2.9.1 Gene RAD52

Um dos mecanismos de reparo de DSBs mais importantes utilizado pelas células é a recombinação homóloga (HR). A HR é a forma mais complexa de reparo por exigir um molde de DNA (ROTHENBERG et al., 2008). De forma geral, o reparo por HR é iniciado por uma deterioração na dupla fita de DNA fornecendo assim uma cauda 3' de fita simples. Em seguida, as proteínas Rad51 e Dcm1 se ligam a essa região para iniciar o pareamento com uma sequência homóloga de DNA. A região 3' fornecida pela degradação do DNA após a quebra é usada como iniciador na síntese da nova sequência (Figura 11). A proteína Rad51 é uma homóloga da recombinase RecA em bactérias e atua no pareamento inicial das fitas simples de DNA (HIOM, 1999).



**Figura 11** - Recombinação Homóloga e Não Homóloga no reparo de DSBs. Modificado de PENG & LIN, 2011.

Por sua vez, as proteínas Ku70 e Ku80 desempenham papel essencial no núcleo onde trabalham reunindo proteínas para a via NHEJ, como por exemplo, a XRCC4, como também na via HR, como por exemplo, a BRCA1 iniciando o processo de reparo de DSBs (Figura 11). Além disso, foi observado que células irradiadas nas quais foram induzidos danos ao DNA a proteína Rad52 é presente em células XRCC4 deficientes, mas não em células deficientes em Ku80 (KOIKE et al., 2013).

A proteína RAD52 pertence a um grupo ubíquo de proteínas mediadoras de recombinação, cuja função é essencial para recombinação homóloga (HR), reparo direto do DNA e resgate de forquilhas de replicação em colapso, atuando com um papel chave na manutenção da integridade do DNA (HIOM, 1999). O reparo de DSBs que ocorre através desse grupo de proteínas geralmente não apresenta erros, pois a informação genética na ruptura da fita dupla é restaurada a partir de uma cópia intacta provinda de outras partes do genoma (MORTENSEN et al., 2009).

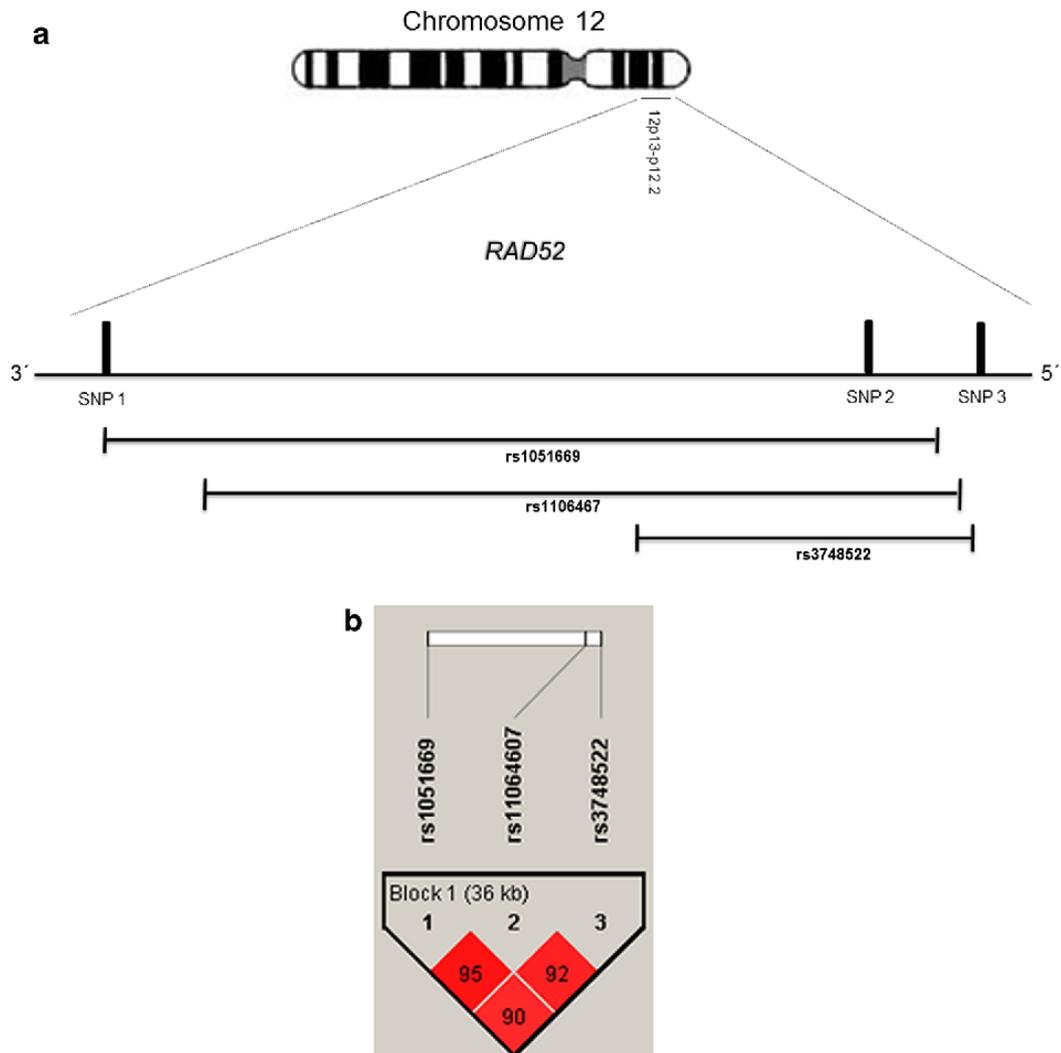
A localização nuclear da Rad52 e acumulação em sítios de DSBs são dependentes de oito aminoácidos (411-418) na extremidade da região C-terminal de Rad52 (Rad52 CTR). Estes aminoácidos são altamente conservados entre mamíferos, aves, peixes e homólogos, sugerindo que Rad52 CTR é importante para a regulação e função de Rad52 em vertebrados. Estes resultados sugerem a importância da Rad52 na via de reparo de danos ao DNA radioinduzidos (KOIKE et al., 2013).

O gene RAD52 homólogo está localizado no cromossomo 12 (12p13.33), apresenta 13 éxons e codifica uma proteína essencial nos estágios iniciais de reparo por HR. A proteína Rad52 interage com a proteína de recombinação do DNA Rad51, mediando a sua função. A Rad52 humana atua também como uma proteína alternativa mediadora da ação de BRCA2 (HIOM, 1999). A RAD52 é uma das mais importantes proteínas que atuam na HR, e células tumorais com mutações deletérias no RAD52 apresentam um mecanismo de HR completamente defeituoso (DANOY et al., 2008).

Estudos recentes sugerem a aplicação de pequenas moléculas inibidoras de RAD52 quanto ao seu potencial como futura droga contra mutações no gene BRCA em células de carcinoma (CHANDRAMOULY et al., 2015; SULLIVAN et al., 2016). SNPs no *RAD52* e no *XRCC4* foram associados a uma maior susceptibilidade ao carcinoma de glândulas salivares e variantes genéticas envolvidas com as vias NHEJ e HR do reparo de DSBs contribuem com diferenças na susceptibilidade a esta doença (XU et al., 2015).

Apenas um estudo de associação correlaciona polimorfismos do *RAD52* e a susceptibilidade ao LES, contudo, este estudo não encontrou qualquer associação com a doença (DE AZEVÊDO SILVA et al., 2014). Todavia, no único estudo que avalia

o perfil de expressão do *RAD52*, observou-se expressão diferenciada deste gene em relação ao LES (SANDRIN-GARCIA et al., 2009). No trabalho desenvolvido por De Azevedo Silva e colaboradores (2014) foram avaliados 3 SNPs do gene *RAD52* (rs1051669, rs11064607 e rs3748522) na população do Sudeste Brasileiro. Os TagSNPs avaliados cobriam o gene quase que completamente por desequilíbrio de ligação (Figura 12), incluindo regiões regulatórias como 3'UTRs. Este estudo não encontrou associação entre *RAD52* e o LES a nível genômico, entretanto, esta mesma população foi estudada através da análise de microarray em trabalho desenvolvido por Sandrin-Garcia e colaboradores (2009) apresentando aumento de 169 vezes na expressão do *RAD52* em pacientes lúpicos na fase ativa da doença.



**Figura 12** - a) Estrutura do gene *RAD52* e localização de 3 TagSNPs (rs1051669, rs11064607 e rs3748522). b) Posição dos TagSNPs em gráfico LD gerado pelo software Haploview. Fonte: DE AZEVEDO SILVA et al., 2014.

### 2.9.2 Gene *LIG4*

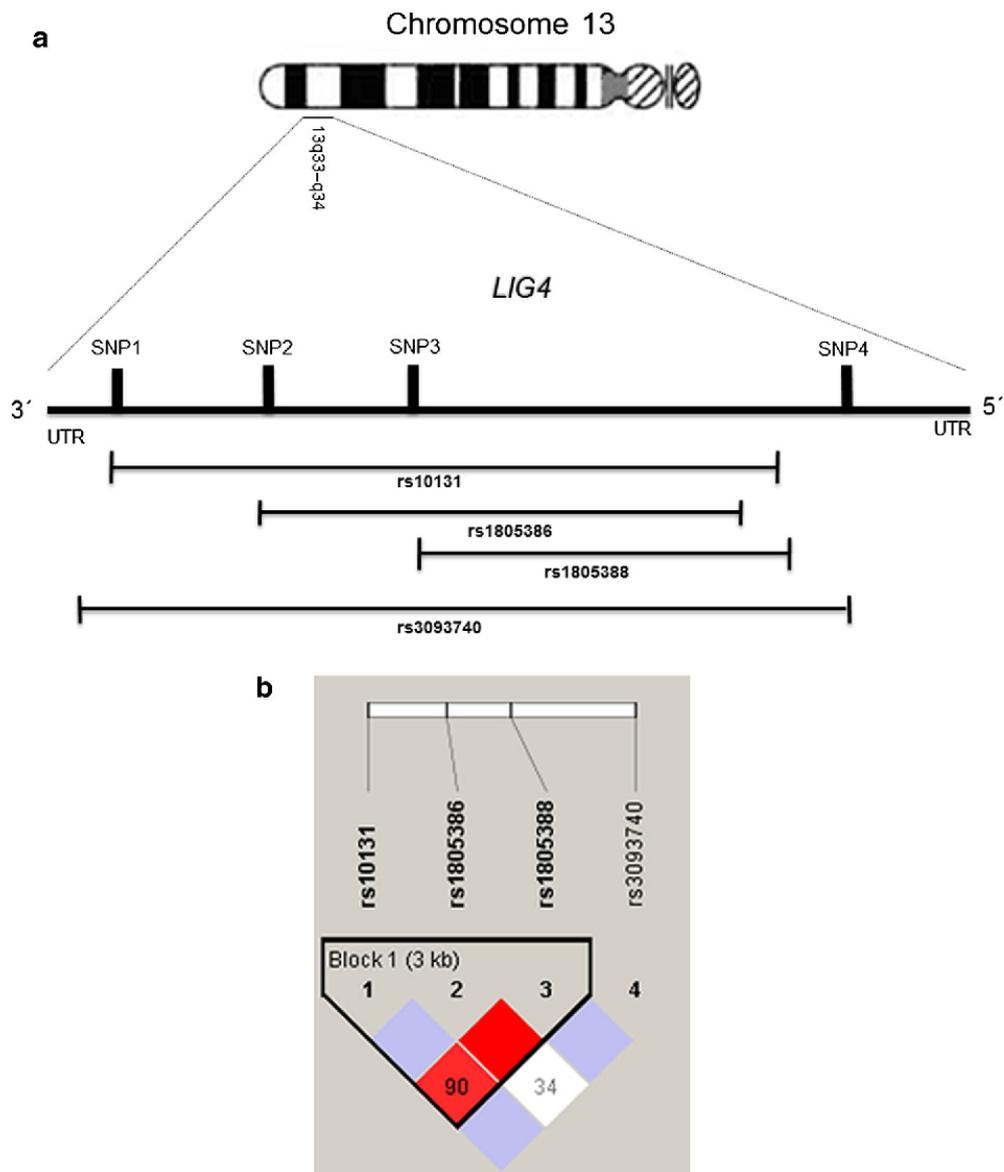
O gene *LIG4* codifica a proteína DNA ligase IV que atua em associação com a proteína *XRCC4* no reparo e recombinação de extremidade não-homólogas (NHEJ). A associação da ligase IV com o *XRCC4* é essencial para o reparo de DSBs através de NHEJ em seres humanos. O gene DNA ligase IV, ou *LIG4*, está localizado no cromossomo 13 (13q33–q34), apresenta 10,9 kb e consiste de 2 éxons e 1 íntron. O cDNA codifica 911 aminoácidos com peso molecular previsto de 96kDa (CHISTIAKOV, et al., 2009).

Dois complexos principais operam durante a NHEJ: uma proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) que reconhece, protege as terminações das DSBs através da sua auto-fosforilação, promove a carga e a ativação de fatores de transformação necessárias para limpar as extremidades antes ligação promovida pelo complexo Cernunnos-XLF / *XRCC4* / ligase IV que é responsável pela etapa de ligação final. Dentro deste complexo o *XRCC4* interage diretamente com a DNA ligase IV, sendo esta instável na ausência de *XRCC4* (Figura 11) (MENCHON et al., 2016).

Estudos em linhagens celulares animais, sem a presença do gene *LIG4* indicaram uma elevada sensibilidade dessas células aos raios X e a agentes prejudiciais ao DNA, devido ao reparo ineficiente de DSBs por NHEJ. A ausência do gene *LIG4* em murinos é letal, causando morte embrionária e apoptose neural massiva, com bloqueio da linfogênese e múltiplos defeitos celulares (FRANK, et al., 1998). Da mesma forma, o knockout do *LIG4* em linhagens de células somáticas humanas exibiu extrema radiosensibilidade, sugerindo que *LIG4* é indispensável para o reparo de DSBs (OH et al., 2013).

A síndrome do *LIG4* é causada por mutações neste gene que envolvem a redução da atividade da ligase no reparo do DNA. A síndrome é caracterizada por radiosensibilidade, microcefalia, anormalidades neurológicas, insuficiência da medula óssea e aumento da susceptibilidade ao câncer (O'DISCOLL et al., 2001; CHISTIAKOV, et al., 2009). Em 2014 De Azevêdo Silva e colaboradores realizaram um estudo de associação onde correlacionaram pela primeira vez polimorfismos no *LIG4* e a susceptibilidade ao LES, eles avaliaram os TagSNPs (rs10131, rs1805386, rs1805388 e rs3093740) (Figura 13) e embora não tenham identificado associação

com a doença, em um estudo prévio realizado com a mesma população através de *microarrays* foi observada uma diminuição de 21 vezes na expressão do *LIG4* em indivíduos lúpicos (SANDRIN-GARCIA et al., 2009).



**Figura 13** - a) Estrutura do gene *LIG4* e localização de 4 TagSNPs (rs10131, rs1805386, rs1805388 e rs3093740). b) Posição dos TagSNPs em gráfico LD gerado pelo software Haploview. Fonte: DE AZEVEDO SILVA et al., 2014.

Em um estudo de Jahanting e colaboradores (2015) foi observada associação de dois genes envolvidos na via do *LIG4*, o *XRCC5* (rs6147172) e o *XRCC7* (rs7003908), com o desenvolvimento do LES. Tais polimorfismos apresentam efeitos funcionais e influenciam diretamente no processo de reparo do DNA, pois a NHEJ depende diretamente dos genes da família XRCC para codificar as proteínas Ku80 (*XRCC5*) e Ku70 (*XRCC6*) que, por sua vez, desempenham papel crucial no recrutamento de proteínas envolvidas com o início do reparo à molécula de DNA (JAHANTIGH et al., 2015). Em um estudo de Bassi e colaboradores (2008), inclusive, foi demonstrada associação do polimorfismo Arg399Gln no *XRCC1* com uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento do LES.

### 2.9.3 Gene STK17A

O gene Serina/treonina quinase 17A (*STK17A*), localizado no braço curto do cromossomo 7 (7p13), também conhecido como *DRAK1* (proteína quinase DAP indutora relacionada a apoptose 1), é um membro da família de proteínas-quinase associadas à apoptose (DAPK). O *STK17A* foi inicialmente clonado a partir de uma biblioteca de cDNA de placenta humana (SANJO et al., 1998; ASHURST et al., 2005).

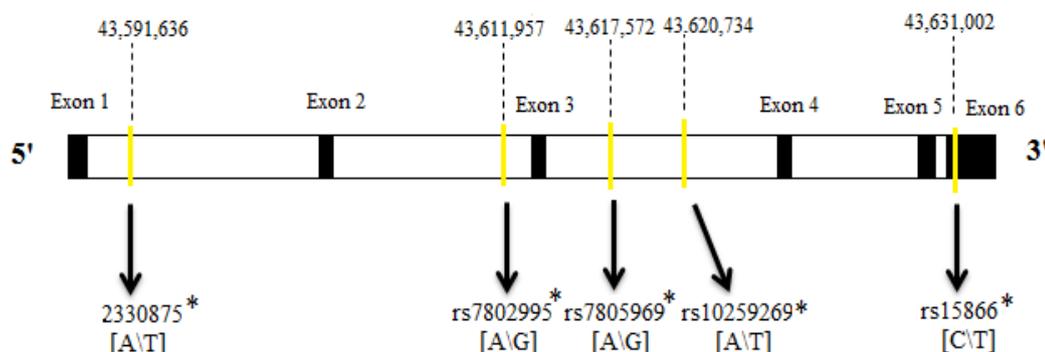
O *STK17A* codifica a proteína nuclear autofosforilada *DRAK1* que apresenta um domínio catalítico N-terminal e um domínio regulador do terminal C e a repressão desse gene foi relatada em vários estudos em associação ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer (SANJO et al., 1998; YANG et al., 2007; PARK et al., 2015). O *STK17A* pode ser ativado em resposta à estímulos externos, como a radiação UV e certas drogas. Além de estar envolvido na regulação positiva do processo de apoptose, participa da regulação de processos nucleares em resposta ao estresse oxidativo à molécula de DNA, através da regulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SANJO et al., 1998; MAO et al., 2011).

Blount e colaboradores (1991) postularam que danos ao DNA provenientes de interação por ROS podem afetar diretamente o desenvolvimento de doenças autoimunes, como o LES. A imunogenicidade do DNA danificado por ROS é aumentada implicando no aumento da produção de anticorpos anti-DNA no lúpus.

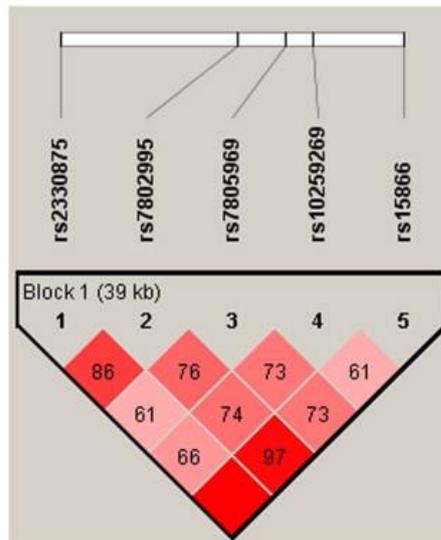
Além disso, o perfil de imunogenicidade e antigenicidade vai depender do mecanismo de produção do ROS, se por radiação ionizante, radiação ultravioleta, agentes químicos ou medicamentos (BLOUNT et al., 1991; COOKE et al., 1996).

Segundo Bashir e colaboradores (1993) os ROS produzidos no sítio de injúria ao interagirem com o DNA podem produzir as SSBs e as DSBs. Sabendo-se que a via das DAP-quinases participa diretamente nos mecanismos de reparo do DNA através da regulação de ROS, mecanismo este que se apresenta comprometido em indivíduos com LES (BLOUNT et al., 1991; COOKE et al., 1996).

Da Silva Fonseca e colaboradores (2013) realizaram o único estudo de associação envolvendo o gene STK17A e o LES. Eles avaliaram a associação de cinco TagSNPs (rs2330875, rs7802995, rs7805969, rs10259269 e rs15866) do gene STK17A e o LES (Figura 14). No estudo, os autores observaram associação do SNP rs7805969 do STK17A com algumas manifestações clínicas da doença, como artrite, alterações cutâneas e alterações imunológicas. Além disso, quando avaliaram estes tagSNPs quanto ao desequilíbrio de ligação (Figura 15) e distribuição de haplótipos, encontraram associação entre os haplótipos TGGTC, TAGTC e AAGAT e risco de desenvolvimento de LES. Ao considerar manifestações clínicas, os haplótipos TGGTT e TAGTC foram associados à proteção contra alterações cutâneas e o haplótipo TAGTC a alterações hematológicas. Nesse mesmo estudo eles também encontraram associação entre manifestações clínicas de LES e a etnia, onde pacientes de origem europeia foram mais suscetíveis a alterações cutâneas e hematológicas que o grupo controle (DA SILVA FONSECA et al., 2013).



**Figura 14** - Estrutura do gene LIG4 e localização dos 5 TagSNPs rs2330875 (A>T), rs7802995 (A>G), rs7805969 (A>G), rs10259269 (A>T) e rs15866 (C>T).



**Figura 15** - Posição dos 5 TagSNPs (rs2330875, rs7802995, rs7805969, rs10259269 e rs15866) do gene STK17A em gráfico LD gerado pelo software Haploview. Fonte: DA SILVA FONSECA et al., 2013.

Tendo em vista que fatores ambientais como a Radiação Ultravioleta e o vírus Epstein Barr influenciam diretamente na patogênese do LES e que a influência ambiental se dá através da ativação de vias da imunidade inata e adaptativa e de vias de reparo de DNA. Estudar os principais genes relacionados a tais vias tais como PTPN22, IFIH1 e VDR, relativos a imunidade inata e adaptativa e RAD52, LIG4 e STK17A, relativos ao reparo de DNA, pode ajudar a elucidar a patogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico, justificando a condução do presente estudo. A hipótese condutora da pesquisa, portanto, é de que genes da imunidade inata e adaptativa e genes de reparo de DNA influenciem na patogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência dos genes da imunidade inata e adaptativa *PTPN22*, *IFIH1* e *VDR*, e dos genes de reparo de DNA *RAD52*, *LIG4* e *STK17A* na patogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência do gene *PTPN22* no LES a partir do SNP rs2476601 1858C>T relacionando os dados de maneira global e por etnia, através de meta-análise.
- Avaliar a possível associação do gene *IFIH1* no LES a partir dos SNPs (rs6432714, rs10930046, rs1990760 e rs3747517) em pacientes lúpicos e controles saudáveis das populações dos estados de São Paulo e Pernambuco e verificar, através de meta-análise, a influência deste gene no LES a partir do SNP rs1990760 relacionando os dados globais com os resultados obtidos no estudo de associação conduzido na população Brasileira.
- Avaliar a possível associação do gene *VDR* no LES a partir dos SNPs (rs11168268, rs2248098, rs1540339, rs4760648, rs3890733, rs2228579 e rs11568820) em pacientes lúpicos e controles saudáveis da população do estado de Pernambuco e verificar o perfil de expressão este gene em indivíduos com LES e indivíduos saudáveis da população do estado de Pernambuco e correlacionar com características clínicas da doença.
- Avaliar a possível associação dos genes *LIG4* (rs10131, rs1805388 e rs3093740), *RAD52* (rs11064607, rs1051669 e rs3748522) e *STK17A* (rs7805969 e rs2330875) em pacientes lúpicos do estado de Pernambuco, correlacionando com a susceptibilidade e manifestações clínicas da doença e verificar o perfil de expressão do gene *RAD52* em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico e controles saudáveis da população do estado de Pernambuco correlacionando com a doença e suas características clínicas.



**ARTIGO 1**

**Artigo publicado no periódico Autoimmunity – Taylor & Francis Online**

**Fator de Impacto: 2.629**

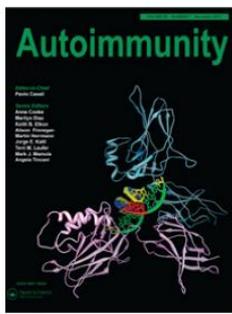
**Qualis Capes: B1**

**PTPN22 1858C > T polymorphism and susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis update**

Suelen Cristina de Lima<sup>a</sup>, José Eduardo Adelino<sup>a,b</sup>, Sergio Crovella<sup>a,b</sup>, Jaqueline de Azevedo Silva<sup>a,b</sup> & Paula Sandrin-Garcia<sup>a,b</sup>

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

b Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil



## PTPN22 1858C > T polymorphism and susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis update

Suelen Cristina de Lima, José Eduardo Adelino, Sergio Crovella, Jaqueline de Azevedo Silva & Paula Sandrin-Garcia

To cite this article: Suelen Cristina de Lima, José Eduardo Adelino, Sergio Crovella, Jaqueline de Azevedo Silva & Paula Sandrin-Garcia (2017) PTPN22 1858C>T polymorphism and susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis update, *Autoimmunity*, 50:7, 428-434, DOI: [10.1080/08916934.2017.1385774](https://doi.org/10.1080/08916934.2017.1385774)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/08916934.2017.1385774>

 View supplementary material 

 Published online: 08 Oct 2017.

 Submit your article to this journal 

 Article views: 16

 View related articles 

 View Crossmark data 

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iaut20>

## PTPN22 1858C > T polymorphism and susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis update

Suelen Cristina de Lima<sup>a</sup>, José Eduardo Adelino<sup>a,b</sup>, Sergio Crovella<sup>a,b</sup>, Jaqueline de Azevedo Silva<sup>a,b</sup> and Paula Sandrin-Garcia<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; <sup>b</sup>Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

### ABSTRACT

Studies performed in the past years showed *PTNP22* 1858C > T (rs2476601) polymorphism as associated with systemic lupus erythematosus susceptibility, although conflicting findings are still found. In this context, a powerful statistical study, such as meta-analysis, is necessary to establish a consensus. The aim of this study was to evaluate association studies between the *PTPN22* 1858C > T polymorphism and SLE by a meta-analysis update, including three recently published studies in the last three years. A total of 3868 SLE patients and 7458 healthy individuals were considered herein, enclosing 19 studies from Asian, American, European and Latin ethnic groups. Odds ratio (OR) was performed for allelic, dominant and recessive genetic models. Statistically significant association was found between the *PTPN22* 1858C > T polymorphism and susceptibility to SLE in all inheritance models. Allelic genetic model data (OR = 1.54, 95% confidence interval (CI) = 1.38–1.72, *p* value = .000) shows that T allele confers increased SLE susceptibility. As well as recessive genetic model (OR = 2.04, 95% CI = 1.09–3.82, *p* value = .030) for T/T genotype. Instead, dominant genetic model shows that C/C genotype confers lower susceptibility for SLE development (OR = 0.62, 95% CI = 0.54–0.72, *p* value = .000). In addition, we provided an ethnicity-derived meta-analysis. The results showed association in Caucasian (OR = 1.47, *p* value = .000) and Latin (OR = 2.41, *p* value = .000) ethnic groups. However, rs2476601 polymorphism is not associated nor in Asian (OR = 1.31; *p* value = .54) and African (OR = 2.04; *p* value = .22) populations. In conclusion, present meta-analysis update confirms that T allele and T/T genotype in *PTPN22* 1858C > T polymorphism confers SLE susceptibility, particular in Caucasian and Latin groups, suggesting *PTPN22* 1858C > T as a potential genetic marker in SLE susceptibility.

### ARTICLE HISTORY

Received 14 February 2017  
Revised 10 September 2017  
Accepted 24 September 2017

### KEYWORDS

Meta-analysis; 1858C > T; polymorphism; SLE

### Background

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multifactorial autoimmune and inflammatory disease characterized by loss of self-tolerance with hyperactivation of autoreactive T and B cells [1]. In SLE pathogenesis, multiple susceptibility genes interact with a variety of environmental factors producing autoantibodies against nuclear antigens leading to autoimmunity that affects several tissues and organs, resulting in heterogeneous clinical and immunological manifestations [2].

Protein tyrosine phosphatase non-receptor type-22 (*PTPN22*) gene is located at chromosome 1 (1p13.1-1p13.3) and encodes a lymphoid tyrosine phosphatase known as Lyp protein, an important negative regulator of T-cell signalling. Lyp is a kinase suppressor of T lymphocytes activation [3,4]. The single nucleotide polymorphism (SNP) 1858C > T (rs2476601) results in amino acid change from arginine (R) to tryptophan (W), also called R620W, resulting in interaction disruption between Lyp and Csk and aberrant deregulation of T cells [5].

Genome Wide Association Studies (GWAS) and case-control studies indicated that *PTPN22* is the second most important deregulated gene in autoimmune disorders [3]. Moreover, decreased or absent *PTPN22* mRNA expression in SLE patients suggests that Lyp plays an important regulatory role, and its absence contributes to the inflammatory response and disease activity in SLE [6].

The *PTPN22* 1858C > T has a variable worldwide distribution and has already been studied in several populations as Asian, American, European and Latin. *PTPN22* 1858C > T is also associated with multiple autoimmune diseases as rheumatoid arthritis, type-1 diabetes, autoimmune thyroid disease and SLE [7,8]. However, the key reason to conflicting results in association studies is the genetic diversity. In this context, a worldwide and ethnic-driven meta-analysis are required to improve a statistical and powerful data by enough sample size in different studies of diverse populations. Thus, we performed a global meta-analysis update for *PTPN22* 1858C > T (rs2476601) in SLE disease



**ARTIGO 2****Artigo publicado no periódico GMR – Genetics & Molecular Genetics****Fator de Impacto: 0.98****Qualis Capes: B4****Association of gene polymorphisms of interferon-induced with helicase C domain (*IFIH1*) with systemic lupus erythematosus and a relevant updated meta-analysis**

J. de Azevêdo Silva<sup>1§</sup>, S.C. de Lima<sup>1</sup>, C. Addobbati<sup>1,2</sup>, R. Moura<sup>1,2</sup>, L.A. Cavalcanti Brandão<sup>1,2,3</sup>, J.A. Três Pancoto<sup>4</sup>, E.A. Donadi<sup>5</sup>, S. Crovella<sup>1,2</sup> and P. Sandrin-Garcia<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>2</sup> Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>3</sup> Department of Pathology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>4</sup> Federal University of Espírito Santo, São Mateus, Espírito Santo, Brasil

<sup>5</sup> Division of Clinical Immunology, Department of Medicine, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil



# Association of interferon-induced helicase C domain (*IFIH1*) gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus and a relevant updated meta-analysis

J. De Azevedo Silva<sup>1,2</sup>, S.C. Lima<sup>1</sup>, C. Addobbati<sup>1,2</sup>, R. Moura<sup>1,2</sup>,  
L.A. Cavalcanti Brandão<sup>1,2,3</sup>, J.A. Três Pancoto<sup>4</sup>, E.A. Donadi<sup>5</sup>,  
S. Crovella<sup>1,2</sup> and P. Sandrin-Garcia<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Patologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

<sup>4</sup>Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, ES, Brasil

<sup>5</sup>Divisão de Imunologia Clínica, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Corresponding author: J. De Azevedo Silva  
E-mail: j.azvedo@gmail.com

Genet. Mol. Res. 15 (4): gmr15048008

Received November 5, 2015

Accepted February 19, 2016

Published October 24, 2016

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr15048008>

Copyright © 2016 The Authors. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution ShareAlike (CC BY-SA) 4.0 License.

**ABSTRACT.** Systemic lupus erythematosus (SLE) is a complex autoimmune disorder presenting heterogeneous clinical manifestations. A number of genes involved in SLE susceptibility are related to the type

I interferon (IFN) pathway. IFN mediates innate immune responses and its increased levels contribute to the breakdown of peripheral tolerance. Interferon-induced helicase C domain 1 (IFIH1) activates and modulates IFN responses through its caspase recruitment domain. In this study, we analyzed four *IFIH1* single nucleotide polymorphisms (SNPs): rs6432714, rs10930046, rs1990760, and rs3747517, in 337 patients with SLE and 373 healthy individuals from southeast and northeast Brazil. Our results did not find an association between *IFIH1* SNPs and SLE (P value >0.025 after Bonferroni's adjustment). However, meta-analysis of peer-reviewed articles from 2008 to 2015 and data from this study indicated an association between rs1990760 and SLE onset (P < 0.05). This is the first association analysis on *IFIH1* polymorphisms and SLE susceptibility in Brazilian populations.

**Key words:** IFIH1; SLE; SNPs; SLE clinical manifestations; Meta-analysis

## INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disorder characterized by the formation of pathogenic autoantibodies against nuclear antigens and breakdown of self-tolerance. SLE etiology is not completely known, and genetic predisposition and environmental factors play a key role in its pathogenesis. Additionally, SLE presents extensive and heterogeneous clinical manifestations varying according to ancestry, geography, and particularly gender (Tsokos, 2011). Several of the genes associated with SLE seem related to the type I interferon (IFN) pathway, and lead to increased serum levels of IFN-inducible genes, known as "IFN-signature" (Tsokos, 2011; Choubey, 2012).

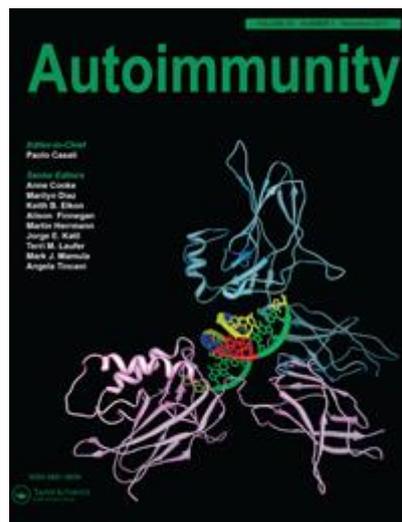
Interferon-induced helicase C domain 1 (*IFIH1*) gene, located at chromosome 2 (2q24), encodes the homonymous protein, which recognizes viral dsRNA in the cytoplasm of infected cells and modulates IFN responses, such as production of pro-inflammatory cytokines and apoptotic processes (Chistiakov, 2010). Genetic association studies have confirmed that *IFIH1* is involved in autoimmune disorders, such as type 1 diabetes and Graves' disease; recently a link to SLE has been investigated (Smyth et al., 2006; Sutherland et al., 2007; Gateva et al., 2009). These studies have revealed that high levels of IFIH1 in lupus-prone mice could accelerate autoimmune processes and exacerbate the disease by increasing the levels of antinuclear autoantibodies (Crampton et al., 2012). Moreover, increased levels of IFIH1 in tissue-specific regions of chronic discoid lupus erythematosus patients (Zahn et al., 2011) indicate a key role in predisposition to SLE.

The association between *IFIH1* polymorphisms and SLE has been investigated in different populations, but not in the Brazilian one. In this study, we assessed the association between four *IFIH1* polymorphisms (rs6432714, rs10930046, rs1990760, and rs3747517) and SLE pathogenesis, as well as its clinical manifestations in Brazilian patients from two different cohorts. In addition, we conducted a meta-analysis of recent literature involving *IFIH1* rs1990760 and SLE susceptibility.



**ARTIGO 3**

Artigo a ser submetido à revista Autoimmunity, ISSN: 0891-6934, Fator de Impacto 2.629



**NEPHRITIC DISORDER AND SKIN ALTERATIONS ARE ASSOCIATED TO  
VITAMIN D RECEPTOR (VDR) GENE POLYMORPHISMS AND DIFERENTIAL  
EXPRESSION IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS**

**Authors:** Jaqueline de Azevêdo Silva<sup>a§</sup>, Suelen Cristina Lima<sup>b</sup>, Thiago Sotero Fragoso<sup>d</sup>, Catarina Addobbati<sup>a,b</sup>, Alexandre Domingues Barbosa<sup>b,c</sup>, Maria Eduarda Bezerra de Albuquerque Borborema<sup>a,b</sup>, Angela Luiza Branco Pinto Duarte<sup>c</sup>, Sergio Crovella<sup>a,b</sup>, Paula Sandrin-Garcia<sup>a,b</sup>

**Affiliation**

<sup>a</sup>. Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>b</sup>. Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>c</sup>. Division of Rheumatology, Hospital das Clínicas, Federal University of Pernambuco, Brazil.

<sup>d</sup>. Rheumatology Service, Clinical Hospital, Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil

§Corresponding author:

Jaqueline de Azevêdo Silva; e-mail: j.azvedo@gmail.com

LIKA/ Federal University of Pernambuco - UFPE

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

Telephone/ Fax 55 8121268522

***Running-title: VDR GENE IN SLE***

## ABSTRACT

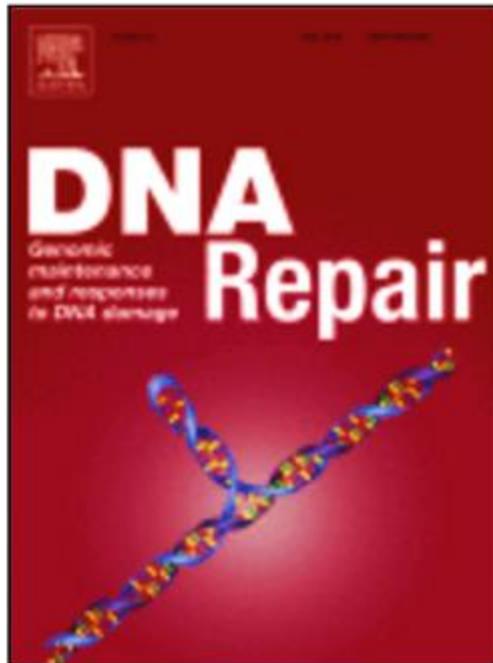
Systemic Lupus Erythematosus is a multifactorial autoimmune disorder that displays an important genetic background. Featured by a wide range of clinical manifestations and several genes associated to disease's development as genetic markers. Vitamin D function through its receptor (VDR) goes beyond the bone metabolism, presenting an important immunomodulatory role in autoimmune misbalance. In the present study, we assessed 5 TagSNPs (rs11168268, rs2248098, rs1540339, rs4760648 and rs3890733) and 2 functional SNPs, rs2228570 (FokI) and rs11568820 (Cdx-2), covering by linkage disequilibrium almost all *VDR* gene, in SLE differential susceptibility and clinical features. We also evaluated *VDR* expression profile in patients and healthy controls, and compared mRNA levels according SNP Cdx-2 genotype. For the genetic association study, 128 SLE patients and 138 healthy controls (HC) were genotyped with fluorogenic specific probes using ABI7500 platform. We detected association between rs11168268 and SLE susceptibility ( $p= 0.008$ ). Our results also showed SNPs rs2248098 and rs2228570 associated to lower SLE susceptibility ( $p= 0.02$  and  $p= 1.77 \times 10^{-13}$ , respectively). Concerning clinical features, our results indicated an association between rs11168268 with nephritic disorder ( $p= 0.01$ ), rs4760658 with photosensitivity ( $p= 0.02$ ), rs1540339 with antibody anti-dsDNA ( $p= 0.015$ ) and rs3890733 with serositis ( $p= 0.01$ ). In gene expression analysis, *VDR* mRNA levels from 29 SLE patients and 17 HC were assessed by qPCR analysis. We identified down-regulation in *VDR* expression levels in SLE patients (-10.51 Fold Change [FC]) when compared to HC group and also the genotypes Cdx-2 A/G and G/G (-9.6 and -12.6 FC, respectively) presented decreased *VDR* expression when compared to A/A genotype. Additionally, was found a differential *VDR* expression in two clinical features analyzed, skin alterations presented up-regulation (+1.3 FC) and nephritic disorder presented a down-regulation (-5.7 FC). Our results indicated *VDR* polymorphisms are associated to SLE and its clinical features and display a down-regulation in SLE patients and presents differential expression in clinical features highlighting the important role of this receptor upon disease's course.

**Keywords:** Nephritic Disorder. Systemic Lupus Erythematosus. Skin alterations. SNP. VDR.



**ARTIGO 4**

Artigo a ser submetido à revista DNA Repair, ISSN: 1568-7864, Fator de Impacto 3.929



**DIFFERENTIAL EXPRESSION OF *RAD52* IN NEPHRITIC DISORDER AND SKIN ALTERATIONS AND ASSOCIATION STUDY OF DNA REPAIR GENES IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS**

**Authors:** Suelen Cristina de Lima<sup>1\*</sup>, Will de Barros Pita<sup>5</sup>, Nadja Maria Jorge Asano<sup>3</sup>, Paulo Roberto Eleutério de Souza<sup>4</sup>, Sergio Crovella<sup>1,2</sup>, Jaqueline de Azevêdo Silva<sup>1,2</sup> and Paula Sandrin-Garcia<sup>1,2</sup>

1. Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil
2. Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil
3. Department of Nephrology, Clinical Hospital of Pernambuco, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil
4. Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil
5. Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

\* Corresponding author: [suelenlima.lp@gmail.com](mailto:suelenlima.lp@gmail.com)

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

Telephone / Fax: +55 81 21262501

***Running title:* DNA REPAIR GENES IN SLE**

## ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disorder characterized by an inappropriate inflammatory response due to immune system failure in the differentiation of self and non-self. SLE establishment, in the majority of patients, results from the combined effect of a large number of gene polymorphisms, including the ones involved in DNA repair pathways. SLE patients display an inefficient DNA repair mechanism that remains to be fully understood. Therefore, herein we assessed eight SNPs within three DNA repair genes: *LIG4* (rs10131, rs1805388, rs3093740), *RAD52* (rs11064607, rs1051669, rs3748522) and *STK17A* (rs7805969, rs2330875) genes, and its possible association in SLE development. Genotyping was performed using fluorogenic probes (Taqman® system) in 202 SLE patients and 190 healthy individuals from Northeast Brazilian population, in order to detect any differential allelic or genotypic distribution in SLE patients or its clinical features. Additionally, we assessed the mRNA expression levels from *RAD52* in 29 SLE patients and 17 healthy controls in whole blood by RT-qPCR. We identified the *RAD52* SNP rs1051669 T allele as associated to SLE susceptibility ( $p= 0.029$ ), however, T allele ( $p= 0.027$ ) and T/T genotype ( $p= 0.006$ ) was associated with lower susceptibility to oral ulcers. We also observed lower susceptibility to development of following clinical manifestations within SLE patients: *LIG4* SNP rs3093740 and nephritic disorder in G/T genotype ( $p= 0.018$ ) and *STK17A* SNP rs2330875 with malar rash in A ( $p= 0.007$ ) allele and A/A genotype ( $p= 0.010$ ). *RAD52* expression assay was also performed and showed down-regulation in SLE patients when comparing to healthy controls (-7.23 Fold Change [FC]). Additionally, was found a differential expression of *RAD52* in two clinical features analyzed, skin alterations presented up-regulation (+4.7 FC) and nephritic disorders a down-regulation (-10.3 FC). Our results indicated DNA repair genes *LIG4*, *RAD52* and *STK17A* polymorphisms are associated to SLE and some clinical SLE features and *RAD52* display a down-regulation in SLE patients and presents differential expression in clinical features highlighting the important role of DNA repair pathways upon disease's course.

**Keywords:** DNA repair genes. Gene expression.. Systemic Lupus Erythematosus. SNPs

## 4 DISCUSSÃO GERAL

O Lúpus Eritematoso Sistêmico é uma doença autoimune de caráter inflamatório que apresenta falhas na atuação da imunidade inata e adaptativa e das vias relacionadas ao reparo ao dano no DNA. Esse comprometimento pode ser determinado por uma série de fatores que atuam em conjunto, tais como fatores ambientais, hormonais, imunológicos e genéticos (TSOKOS, 2011; HAHN, 2012; KIM & CHONG, 2013; WEIDENBUSCH et al., 2017).

No presente estudo analisamos a influência de alguns fatores genéticos no LES, tais como os genes *PTPN22*, *IFIH1*, *VDR*, que atuam na imunidade inata e adaptativa; e também os genes *RAD52*, *LIG4* e *STK17A* que influenciam as principais vias de reparo à danos no DNA. Para tanto, meta-análises, estudos de associação e análise do perfil de expressão foram utilizadas como ferramentas de estudo, sendo produzidos 4 artigos, descritos anteriormente nesta tese de doutorado. A figura 16 mostra uma representação esquemática das principais vias de atuação onde cada gene presente neste estudo interage e poderia estar influenciando na patogênese do LES.

O gene *PTPN22* possui um polimorfismo *missense* (sentido trocado) de único nucleotídeo (rs2476601) na posição 1858 (C>T), que provoca a substituição de um aminoácido arginina no códon 620 (CGG) por um triptofano (TGG) da proteína LYP (variante W620) que atua inibindo a ativação das células T e está envolvida na regulação da sinalização do seu receptor, o TCR, associado a diversas doenças autoimunes inclusive o LES (Figura 16) (WU et al., 2006; FOUSTERI et al., 2013).

Contudo, estudos de associação realizados em diversas populações com o SNP rs2476601 do *PTPN22* apresentam resultados conflitantes, tais resultados justificam a utilização de meta-análises como ferramenta de estudo nesses casos (AKSOY et al., 2011; LEA & LEE, 2011; SHI et al., 2013; OSTANEK et al., 2014).

Os resultados da meta-análise no SNP rs2476601 do *PTPN22* conduzida no presente trabalho mostraram que o alelo T e o genótipo T/T conferem susceptibilidade aumentada ao LES, enquanto o genótipo C/C confere susceptibilidade diminuída ao LES.

# Lúpus Eritematoso Sistêmico

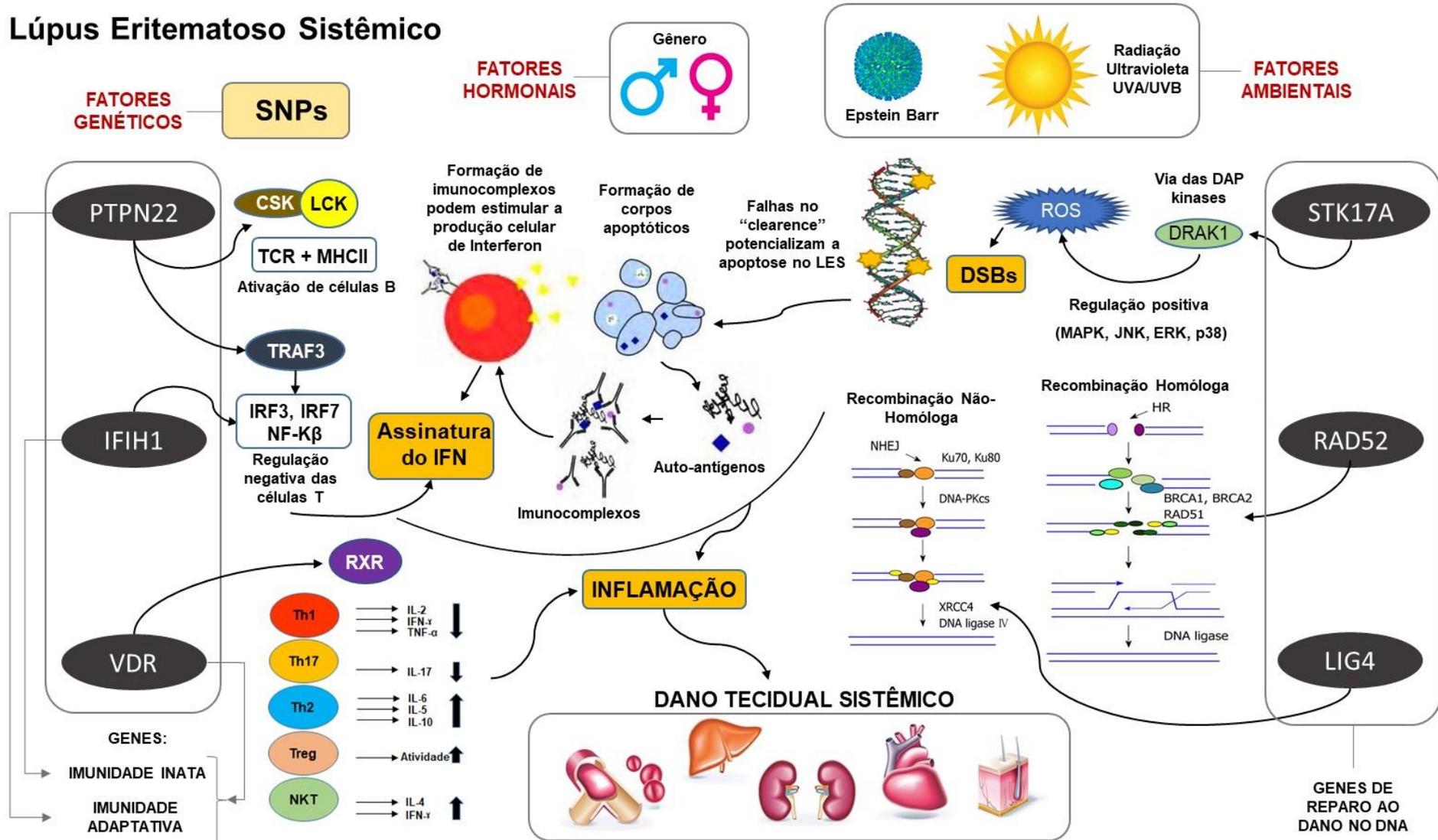


Figura 16 - Representação esquemática da ação dos genes PTPN22, IFIH1, VDR, LIG4, RAD52 e STK17A na patogênese do LES.

Ladner e colaboradores (2005) observaram que as células T e outras células imunes tornam-se hiper-responsivas causando aumento da inflamação e danos nos tecidos na presença do alelo T do SNP rs2476601 do *PTPN22* em uma ou ambas as cópias do gene. Possivelmente, o *PTPN22* influencia na autoimunidade, facilitando o aparecimento e a progressão da doença devido ao aumento na produção de auto-anticorpos, explicando também seu envolvimento com outras doenças autoimunes. Corroborando com nossos dados, três meta-análises conduzidas anteriormente também revelaram associação entre rs2476601 do *PTPN22* e o LES em escala global (LEA & LEE, 2011; ZHENG et al., 2012; SHI et al., 2013). Contudo, o nosso estudo é o primeiro a avaliar tanto um perfil global quanto um perfil étnico de associação nas populações asiática, africana, europeia e latina.

O gene *IFIH1* codifica a proteína citoplasmática MDA5, capaz de reconhecer dsRNAs, encontrados abundantemente em células infectadas pelo vírus Epstein Barr, ativando a sinalização do IFN- $\alpha$ . O IFN- $\alpha$  é amplamente descrito como um alvo terapêutico no LES e a sua presença, descrita como “assinatura de IFN”, já foi bem descrita e amplamente avaliada como marcador biológico para a atividade da doença, tendo em vista que o IFN- $\alpha$  atua ativando a apoptose, iniciando o “*clearance*” dos corpos apoptóticos e ativando a transcrição de fatores como o IFR3, IFR7 e o NF-KB (Figura 16) (CHISTANOVIK, 2010; ELKON & STONE, 2011).

Nesta tese o estudo de associação genética conduzido a partir de quatro SNPs do gene *IFIH1* nas populações do Nordeste e Sudeste do Brasil não detectou qualquer associação entre os SNPs testados e a susceptibilidade ao LES ou às suas características clínicas. A literatura descreve, contudo, que o polimorfismo C>T rs1990760 (Ala946Thr) do *IFIH1* apresenta-se associado ao LES em diversos estudos conduzidos em várias populações como a Européia, Japonesa, Chinesa e Americana (SLEGEN et al., 2008; GATEVA et al., 2009; GONO et al., 2010; CEN et al., 2012; MOLINEROS et al., 2013; ENEVOLD et al., 2014). Tais estudos identificaram que o alelo T do SNP rs1990760 do *IFIH1* está associado ao desenvolvimento da doença, tendo em vista que a expressão diferencial desse gene influencia produção de IFN- $\alpha$  e, conseqüentemente, promove desordens autoimunes (CHISTANOVIK, 2010).

Contudo alguns estudos são contraditórios quanto ao tipo de associação, demonstrando a necessidade de mais estudos deste tipo e da elaboração de meta-análises para melhor elucidar o papel desse polimorfismo no LES (GATEVA et al., 2009; ENEVOLD et al., 2014). A meta-análise conduzida neste estudo mostrou que o

alelo C do SNP rs1990760 está associado a uma menor susceptibilidade ao SLE. Embora nosso estudo corrobore com grande parte dos estudos já realizados, nossos resultados são divergentes em relação a alguns estudos anteriores (GONO et al., 2010; CUNNINGHAME GRAHAN et al., 2011; CEN et al., 2013). Essas diferenças podem ser explicadas levando em consideração a heterogeneidade genética das populações incluídas neste e em outros estudos, como também proposto por Enevold e colaboradores (2014). Nossa análise estatística de sensibilidade, por sua vez, indicou que um grande número de estudos é necessário para produzir resultados de meta-análise mais robustos. Apesar disso, os resultados obtidos nesse estudo reforçam a influência do *IFIH1* na patogênese do LES.

A participação do gene VDR na função imune tem sido o foco de muitos estudos de associação genética a várias doenças autoimunes, incluindo o LES (KONGSBAK et al., 2013). A vitamina D exerce suas funções através da interação com seu receptor específico chamado VDR presente em vários órgãos, tecidos no citoplasma de diversos tipos celulares, e em todas as células do sistema imune, e que ao entrar no núcleo da célula se heterodimeriza com o receptor de ácido retinóico (RXR) (Figura 16), adquirindo a capacidade de interferir na transcrição gênica de diversos genes (KAMEN & TANGPRICHA, 2010; WANG et al., 2012).

No presente estudo de associação genética conduzido a partir de 7 SNPs do gene VDR houve associação de 3 destes SNPs com o LES, além disso, alguns SNPs ainda associaram a características clínicas, tais como: fotossensibilidade (rs4760658), nefrite (rs11168268), anticorpo anti-dsDNA (rs1540339), e serosite (rs3890733) sendo algumas destas associações relatadas pela primeira vez. Encontramos associação entre rs11168268 e rs2248098 e o desenvolvimento do LES, onde o genótipo G/G do rs11168268 (A>G) conferiu maior susceptibilidade ao LES; e onde alelo G, bem como os genótipos A/G e G/G do rs2248098 (A>G) conferiram menor susceptibilidade ao LES. Embora nenhum estudo anterior ao nosso tenha associado esses SNPs a susceptibilidade ao LES, estes já haviam sido relatados associações entre alterações cutâneas (rs11168268) e alterações imunológicas (rs2248098) do LES em um estudo populacional do Sudeste do Brasil (DE AZEVÊDO SILVA et al., 2014).

Em nosso estudo de associação observou-se, também, que no SNP rs2228570 (FokI) (C>T) a presença do alelo C, bem como os genótipos C/T e C/C indicaram uma menor susceptibilidade ao LES. Dzheibir e colaboradores (2016) descreveram que o alelo C do SNP FokI (variante mais curta da proteína) provavelmente interage mais

fortemente com o fator de transcrição TFIIB do que em relação à variante mais longa, sugerindo que a proteína VDR mais curta seria mais eficiente na via de ativação de vitamina D. Na análise de expressão gênica realizada nos pacientes lúpicos, o gene VDR apresentou expressão diminuída quando comparado aos indivíduos saudáveis. Além disso, na expressão genótipo guiada do VDR em pacientes lúpicos de acordo com o SNP rs11568820 (Cdx-2) foi observada uma diminuição na expressão em pacientes com genótipos G/A e G/G, quando comparado com o genótipo A/A, indicando que o alelo G diminuiria a expressão do VDR nesses indivíduos.

É conhecido que pacientes com LES apresentam níveis baixos de vitamina D em comparação com indivíduos saudáveis (XIAO et al., 2016). A vitamina D inibe a ação das células B ativadas e induz sua apoptose, por sua vez as células B expressam mRNAs para proteínas envolvidas na atividade da vitamina D, incluindo o VDR, que consequentemente é regulado pelos níveis de vitamina D (CHEN et al., 2007). Ao avaliar a expressão do VDR em relação ao risco de desenvolvimento de manifestações clínicas no LES, nossos resultados mostraram que pacientes com alterações cutâneas apresentam um aumento na expressão do VDR. Os estudos conduzidos por MacLaughlin e colaboradores (1982) e Lee e colaboradores (2013) mostram que mesmo que outros tipos de células apresentem menor expressão do VDR, as células da pele podem expressar normalmente o receptor de vitamina D. Esses tipos de células convertem a 25-hidroxivitamina D circulante para 1,25-dihidroxivitamina D para uso local, regulando a expressão de VDR localmente. Observamos que, como a região Nordeste do Brasil possui uma maior exposição à luz UV quando comparada às outras regiões do país, provavelmente estaria ocorrendo um aumento da regulação do mRNA do VDR nas células da pele nesta população de indivíduos lúpicos. Nosso estudo também mostrou uma menor expressão do VDR em pacientes que apresentam nefrite lúpica. Vários estudos já haviam evidenciado o papel do VDR na nefrite lúpica (OZAKI, 2000; LUO et al., 2011; MOSTOWSKA et al., 2013; EMERAH & EL-SHAL, 2013). A nefrite tem papel significativo na deficiência de vitamina D em pacientes com LES, que apresentam níveis significativamente mais baixos de vitamina D (SUMETHKUL et al., 2013), justificando a redução da regulação do VDR. Além disso, esse foi o primeiro trabalho a apresentar dados de expressão de nefrite em pacientes lúpicos, reforçando assim a importância do VDR na patogênese do LES e de suas características clínicas.

O gene *RAD52* atua iniciando a via de recombinação homóloga, principal via de reparo de danos no DNA (Figura 16) e alterações neste gene podem levar a uma via completamente defeituosa (MUÑOZ-GALVÁN et al., 2013; MA et al., 2013). Diferenças inter-indivíduos no número de cópias de genes podem resultar em um fator de proteção ou risco para a susceptibilidade ao LES (YANG et al., 2007). No estudo de associação realizado com os genes de reparo do DNA, o SNP rs1051669 do *RAD52* foi o único que apresentou associação com o LES, onde o alelo T foi associado à uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento da doença, embora o mesmo alelo T, bem como o genótipo T/T tenham se apresentado associados à uma menor susceptibilidade ao surgimento de úlceras orais nos pacientes lúpicos na população do Nordeste brasileiro. Este polimorfismo específico foi previamente estudado por nosso grupo de pesquisa na população do Sudeste do Brasil (DE AZEVEDO SILVA et al., 2014). No entanto, nenhuma associação foi identificada quanto ao desenvolvimento de LES para esta população.

Em um estudo de Shi e colaboradores (2012) o alelo T do SNP rs1051669 do *RAD52* foi significativamente associado ao aumento da expressão da proteína *RAD52*. Assim, no presente trabalho também foi avaliado os níveis de expressão do *RAD52* na população do Nordeste brasileiro e observou-se uma expressão diminuída desse gene em pacientes com LES quando comparado com o grupo controle saudável. Um estudo realizado por Sandrin-Garcia e colaboradores (2009) na população do Sudeste do Brasil mostrou que o *RAD52* apresenta expressão aumentada em 169 vezes na fase ativa da doença. Bohm e colaboradores (2005), compararam indivíduos de origem europeia e africana e destacaram os componentes étnicos e ambientais como fatores importantes no desenvolvimento e progressão da doença. No presente estudo pacientes com alterações cutâneas apresentaram expressão aumentada do *RAD52* em relação aos pacientes que não apresentam essa característica clínica. As alterações da pele e a fotossensibilidade normalmente ocorrem em indivíduos com LES devido à exposição à luz UV e essas características clínicas são principalmente encontradas na fase ativa do LES (UVA et al., 2012; DOSS et al., 2015). Tais características estão associadas à fase ativa da doença e nesta fase a recombinação homóloga representa uma das primeiras vias de reparo ao dano, o que poderia justificar aumento na expressão da *RAD52*.

Por outro lado, nós identificamos que pacientes com nefrite lúpica apresentaram expressão diminuída do *RAD52*. Pacientes com nefrite apresentam

reparo de DSBs e reparo de excisão de nucleotídeo defeituosos promovendo maior nível de dano no DNA (SOULIOTIS et al., 2016). Defeitos nestes mecanismos podem diminuir o processo de reparo, induzindo a apoptose e promovendo deposição de imunocomplexos nos rins, induzindo assim o processo inflamatório local conhecido como nefrite. Tendo em vista que o *RAD52* está diretamente envolvido na HR, isso justifica uma menor expressão desse gene no LES e na nefrite lúpica, pois nessa fase estariam sendo ativados os genes relacionados aos processo de apoptose. Para o nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro a correlacionar a expressão do *RAD52* com o LES e com suas características clínicas.

Neste mesmo estudo também identificamos associação entre o genótipo G/T do SNP rs3093740 do *LIG4* a uma menor susceptibilidade a nefrite em pacientes com LES. Defeitos neste gene repercutem diretamente na desregulação da via de recombinação não-homóloga (NHEJ) (Figura 16). Embora a via HR seja mais precisa no reparo de DSBs, a via NHEJ é a via mais frequentemente recrutada e defeitos nesta via afetam diretamente a manutenção e integridade do genoma (SONODA et al., 2006; BURMA et al., 2006). Sugerimos, portanto, que SNPs no *LIG4*, envolvidos diretamente no reparo do NHEJ, possam influenciar os resultados clínicos em pacientes com LES. Alguns estudos inclusive mostraram que outros SNPs no *LIG4* estão associados com aumento da radiorresistência à radioterapia (YIN et al., 2012; MUMBREKAR et al., 2016).

O gene *STK17A*, por sua vez, regula os processos nucleares em resposta ao dano oxidativo no DNA e está envolvido na via apoptótica, sendo ativado em resposta a fatores ambientais, como a exposição à luz UV (Figura 16) (SANJO et al., 1998; MAO et al., 2011). Nosso estudo de associação mostrou uma menor susceptibilidade de indivíduos lúpicos que apresentam alelo A e genótipo A/A do SNP rs2330875 do *STK17A* desenvolverem erupção cutânea. Indivíduos lúpicos apresentam manifestações cutâneas aumentadas em resposta a quebras no DNA, induzindo resposta imune devido à deposição de corpos apoptóticos e posterior formação de imunocomplexos, justificando inflamação e vermelhidão após exposição à luz UV (SANJO et al., 1998; MAO et al., 2011). Embora a exposição à radiação UV tenha sido relacionada ao desenvolvimento de várias manifestações clínicas no LES, no presente estudo, conduzido na população do Nordeste brasileiro, SNPs nos genes de reparo ao dano no DNA foram associados à proteção ao desenvolvimento de algumas características clínicas do LES. O que poderia justificar nossos resultados seria o fato

de que a população brasileira do Nordeste geralmente apresenta maior exposição à luz UV quando comparada às outras regiões do Brasil, resultando em maior produção de melanina. A melanina, por sua vez, atua como uma proteção natural a exposição à luz solar (BOHM et al., 2005). Além disso, a melanina reduz a produção de ROS, sendo assim quantidades menores de ROS induzem menos formação de DSBs e menor recrutamento de proteínas de reparo do DNA.

Os dados obtidos nesse estudo reforçam a importância do componente genético no desenvolvimento do LES e de suas características clínicas. Sabendo que a imunidade inata e adaptativa e as vias de reparo ao dano no DNA são mecanismos cruciais para o surgimento e progressão da doença. Estudar os genes que interferem nesses mecanismos ajuda a elucidar a fisiopatologia da doença e suscita o uso destes genes como marcadores moleculares para o LES.

## 5 CONCLUSÕES

- A meta-análise conduzida a partir do SNP rs2476601 do *PTPN22* 1858 C>T demonstrou que o alelo T e o genótipo T/T aumentam o risco no desenvolvimento de LES. Além disso, identificamos influência étnica na associação do *PTPN22* 1858 C>T com susceptibilidade à doença. Sugerimos, portanto, que o SNP rs2476601 seria um potencial marcador genético para o LES.
- O estudo de associação genética dos SNPs do *IFIH1* conduzido em duas diferentes populações brasileiras não detectou qualquer associação entre os SNP testados e a suscetibilidade ao LES ou suas características clínicas. Por sua vez, a meta-análise conduzida a partir do SNP rs1990760 mostrou que o alelo C está associado a uma menor susceptibilidade ao SLE, indicando a importância desse gene na patogênese do LES.
- O estudo de associação genética conduzido a partir de SNPs do gene *VDR* mostrou associação com o LES e com as características clínicas: fotossensibilidade, nefrite, anticorpo anti-dsDNA e serosite; sendo algumas destas associações relatadas pela primeira vez. O perfil de expressão do *VDR* indicou uma maior expressão gênica quando comparado a indivíduos saudáveis. Também foi detectado níveis diferenciais de expressão do *VDR* em relação a alterações de pele e nefrite, demonstrando sua influência no LES e nas suas características clínicas.
- O estudo de associação dos genes de reparo do DNA demonstrou que o alelo T do SNP rs1051669 do *RAD52* está associado a uma maior susceptibilidade ao LES, embora o mesmo alelo T e o genótipo T/T estejam associados a uma menor susceptibilidade a úlceras orais em pacientes lúpicos. Além disso, polimorfismos do *LIG4* e no *STK17A* mostraram associação à menor susceptibilidade a nefrite e erupção cutânea, respectivamente, em pacientes lúpicos. O perfil de expressão do *RAD52* mostrou uma menor expressão em pacientes com LES e expressão diferencial em relação a alterações de pele e nefrite, destacando a importância das vias de reparo do DNA no curso da doença.

## REFERÊNCIAS

- AKSOY, R. et al. No association of PTPN22 R620W gene polymorphism with rheumatic heart disease and systemic lupus erythematosus. **Mol Biol Rep.**, v. 38, n.8, p. 5393–5396, 2011.
- ASHURST, J. L. et al. The Vertebrate Genome Annotation (Vega) database. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, p. 459–65. 2005.
- BASHIR, S. G. et al. Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 52, n. 9, p. 659-666, 1993.
- BASSI, C. et al. Efficiency of the DNA repair and polymorphisms of the XRCC1, XRCC3 and XRCC4 DNA repair genes in systemic lupus erythematosus. **Lupus.**, v. 17, p. 988–995, 2008.
- BLOUNT, S.; GRIFFITHS H.R.; LUNEC, J. Reactive oxygen species damage to DNA and its role in systemic lupus erythematosus. **Mol Asp Med.**, v. 12, p. 93–105, 1991.
- BOHM, M. et al. Alpha-melanocystestimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. **J Biol Chem.**, v. 7, p. 5795–5802, 2005. doi:10.1074/jbc.M406334200.
- BORBA, E.F. et al. Consenso de lúpus eritematoso sistêmico. **Rev Bras Reumatol.**, v. 48, n. 4, p. 196-207, 2008.
- BOUCAS, A. P. et al. The role of interferon induced with helicase C domain 1 (IFIH1) in the development of type 1 diabetes mellitus. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 57, n. 9, p. 667-676, 2013. doi:10.1590/S0004-27302013000900001.
- BRASIL-COSTA, I. et al. Avaliação diagnóstica das infecções por vírus Epstein-Barr, parvovírus B19 e vírus linfotrópico de células T humanas em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico em hospital de referência do Estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude [online]**., v. 7, n.esp. p. 167-176. 2016. doi:10.5123/s2176-62232016000500019.
- BURN, G. L. et al. Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? **FEBS Lett.**, v. 585, n. 23, p. 3689–3698. Publicado eletronicamente antes da versão impressa em: 2011 apr. 20.
- CAMPBELL, A. W. Autoimmunity and the Gut. **Autoimmune Dis.** Publicado eletronicamente antes da versão impressa em: 2014 may. 13.
- CANTORNA, M. T. Vitamin D and autoimmunity: is vitamin D status an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence? **Proc Soc Exp Biol Med.**, v. 223, n. 3, p. 230-3, 2000.

CASTREJÓN, I. et al. Indices to assess patients with systemic lupus erythematosus in clinical trials, long-term observational studies, and clinical care. **Clin Exp Rheumatol.**, v. 32, n. 85, p. S85-S95, 2014.

CEN, H. et al. Association Study of IFIH1 rs1990760 Polymorphism with Systemic Lupus Erythematosus in a Chinese Population. **Inflammation.**, v. 2, p. 444-8, 2003.

CHANDRAMOULY, G. et al. Small-Molecule Disruption of RAD52 Rings as a Mechanism for Precision Medicine in BRCA-Deficient Cancers. **Chem Biol.**, v. 22, n.11, p. 1491–504, 2015. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.10.003.

CHAO, L. D. et al. A RAD52 genetic variant located in a miRNA binding site is associated with glioma risk in Han Chinese. **J. Neuro-Oncology.** v. 120, n. 1, p. 11–17, 2014.

CHEN, S. et al. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. **J Immunol.**, v. 179, n. 3, p. 1634-47, 2007.  
doi:10.4049/jimmunol.179.3.1634

CHISTIYAKOV, D. A. Interferon Induced with Helicase C Domain 1 (IFIH1) and Virus-Induced Autoimmunity: A Review. **Viral Immunology.**, v. 23, n.1, p. 3-15, 2010.  
doi:10.1089/vim.2009.0071

CHISTIYAKOV, D. A.; VORONOVA, N. V.; CHISTIYAKOV, A. P. Ligase IV syndrome. **Eur J Med Genet.**, v. 52, n. 6, p. 373-8, 2009. Publicado eletronicamente antes da versão impressa em: 2009 may. 23. doi: 10.1016/j.ejmg.2009.05.009.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem.**, v. 162, n. 1, p. 156-9, 1987.

CHUNG, S. A.; CRISWELL, L. A. PTPN22: Its role in SLE and autoimmunity. **Autoimmunity.**, v. 40, n. 8, p. 582-590, 2007. doi:10.1080/089169307015 10848.

CLARK, D. N.; POOLE, B. D. Interferon and Apoptosis in Systemic Lupus Erythematosus, **Systemic Lupus Erythematosus**, Dr Hani Almoallim (Ed.), InTech, 2012. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/systemic-lupus-erythematosus/interferon-in-systemic-lupus-erythematosus>. doi: 10.5772/25734.

COOKE, S. M. et al. Immunogenicity of DNA Damaged by Reactive Oxygen Species Implications for Anti-DNA Antibodies in Lupus. **Free Radical Biology and Medicine.**, v. 22, n. 1-2, p. 151-15, 1997.

CRAMPTON, S. P.; MORAWSKI, P. A.; BOLLAND, S. Linking susceptibility genes and pathogenesis mechanisms using mouse models of systemic lupus erythematosus. **Disease Models & Mechanisms.**, v. 7, n. 9, p. 1033-1046, 2014.  
doi:10.1242/dmm.016451.

- CROW, M. K. Type I Interferon in the Pathogenesis of Lupus. **Journal of immunology** (Baltimore, Md : 1950)., v. 192, n. 12, p. 5459-5468, 2014. doi:10.4049/jimmunol.1002795.
- CUNNINGHAME GRAHAM, D. S. et al. Association of NCF2, IKZF1, IRF8, IFIH1, and TYK2 with systemic lupus erythematosus. **PLoS Genet.**, v. 7, n 10, p. e1002341, 2011.
- DA SILVA FONSECA, A.M. et al. Polymorphisms in STK17A gene are associated with systemic lupus erythematosus and its clinical manifestations. **Gene.**, v. 25;527, n. 2, p. 435-9, 2013.
- DANOY, P. et al. Variants in DNA double-strand break repair and DNA damage-response genes and susceptibility to lung and head and neck cancers. **J Int Canc.**, v. 123, p. 457–63. 2008.
- DE AZEVÊDO SILVA, J. et al. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and age onset in type 1 diabetes mellitus. **Autoimmunity.**, v. 46, n. 6, p. 382-387, 2013.
- DE AZEVÊDO SILVA, J. et al. LIG4 and RAD52 DNA repair genes polymorphisms and systemic lupus erythematosus. **Mol Biol Rep.**, v. 41, n. 4, p. 2249–56, 2014.
- DI ROSA, M. et al. Vitamin D3: a helpful immuno-modulator. **Immunology.**, v. 134, n. 2, p. 123-139, 2011.
- DOSS, R. W. et al. Vitamin D Receptor Expression in Vitiligo. **Indian Journal of Dermatology.**, v. 60, n. 6, p. 544-548, 2015. doi:10.4103/0019-5154.169123.
- DOUKI, T. et al. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation. **Biochemistry.**, v. 5;42, n. 30, p. 9221-6, 2003.
- DRABORG, A. H. et al. Impaired Cytokine Responses to Epstein-Barr Virus Antigens in Systemic Lupus Erythematosus Patients. **Journal of Immunology Research.**, v. 2016, Article ID. 6473204. 16 pages, 2016. doi:10.1155/2016/6473204
- DRABORG, A. H.; DUUS, K.; HOUEN, G. "Epstein-Barr Virus and Systemic Lupus Erythematosus," **Clinical and Developmental Immunology.**, v. 2012, 370516, 10 pages, 2012. doi:10.1155/2012/370516
- DZHEBIR, G. et al. Association of vitamin D receptor gene BsmI B/b and FokI F/f polymorphisms with adult dermatomyositis and systemic lupus erythematosus. **International Journal of Dermatology.**, v. 55, n. 8, p. e465–e468, 2016. doi: 10.1111/ijd.13263.
- ELKON, K. B.; STONE, V. V. Type I Interferon and Systemic Lupus Erythematosus. **Journal of Interferon & Cytokine Research.**, v. 31, n. 11, p. 803-812, 2011. doi:10.1089/jir.2011.0045.

EMERAH, A. A.; EL-SHAL, A. S. Role of vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D level in Egyptian female patients with systemic lupus erythematosus. **Mol Biol Rep.**, v. 40, p. 6151-62, 2013.

ENEVOLD, C. et al. Single nucleotide polymorphisms in genes encoding toll-like receptors 7, 8 and 9 in Danish patients with systemic lupus erythematosus. **Molecular biology reports.**, v. 41, n. 9, p. 5755–63, 2014.

ESTELLER, M. Non-coding RNAs in human disease. **Nat Rev Genet.**, v. 12, p. 861–874, 2011.

FARRELL, P. J. Epstein-Barr virus. The B95-8 strain map. **Methods in Molecular Biology.**, v. 174, p. 3–12, 2001.

FOUSTERI, G.; STAMATIS-NICK, C. L.; BATTAGLIA, M. Roles of the protein tyrosine phosphatase PTN22 in immunity and autoimmunity. **Clin Immunology.**, v. 149, p. 556–565, 2013.

FRANK, K.M. et al. Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. **Nature.**, v. 396, p. 173-177, 1998.

GARINIS, G. A.; JANS, J.; VAN DER HORST, G. T. Photolyases: capturing the light to battle skin cancer. **Future Oncol.**, v. 2, n. 2, p. 191-199, 2006.

GATEVA, V. et al. A Large-Scale Replication Study Identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as Risk Loci for Systemic Lupus Erythematosus. **Nature genetics.**, v. 41, n. 11, p. 1228–1233, 2009.

GIANCIECCHI, E.; PALOMBI, M.; FIERABRACCI, A. The putative role of the C1858T polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 gene in autoimmunity. **Autoimmun Rev.**, v. 12, p. 717–725, 2013.

GILES, B. M.; BOACKLE, S. A. Linking complement and anti-dsDNA antibodies in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Immunologic research.**, v. 55, n. 0, p. 10-21, 2013. doi:10.1007/s12026-012-8345-z.

GONO, T. et al. Interferon-induced helicase (IFIH1) polymorphism with systemic lupus erythematosus and dermatomyositis/polymyositis. **Mod Rheumatol.**, v. 5, p. 466–70, 2010.

HAHN, B. Systemic lupus erythematosus. In: **Harrison`s Principles of Internal Medicine** (McGrawHill, ed. 18). New York. 2012.

HARLEY, B. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. **Genes Immun** [online]. v. 10, n. 5, p. 373–9, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3144759/>

HARLEY, J. B.; JAMES, J. A. Epstein-Barr virus infection induces lupus autoimmunity. **Bull NYU Hosp Jt Dis.**, v. 64, n. 1-2, p. 45-50, 2006.

HARM, W. Biological effects of ultraviolet radiation. United Kingdom: **University Press.**, 1980.

HAYES, C. E. et al. Vitamin D actions on CD4(+) T cells in autoimmune disease. **Front Immunol.**, eCollection 2015. v. 6, p. 100, 2015. doi:10.3389/fimmu.2015.00100.

HE, X. J. et al. Roles of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and Vitamin D Receptor in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus by Regulating the Activation of CD4+ T Cells and the PKC $\delta$ /ERK Signaling Pathway. **Cell Physiol Biochem.**, v. 40, n. 3-4, p. 743-756, 2016. Publicado eletronicamente antes da versão impressa em: 2016 dec. 5.

HECHT, E. Óptica. **Addison Wesley.** 2000.

HIOM, K. Dna repair: Rad52 - the means to an end. **Curr Biol.**,v. 17, n. 9(12), p. R446-8, 1999.

HOCHBERG, M. C. et al. Rheumatology. **Elsevier.**, v. 2, ed. 6, 2016.

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

HOLICK, C. N. et al. Comprehensive Association Analysis of the Vitamin D Pathway Genes, VDR, CYP27B1, and CYP24A1, in Prostate Cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 16, n. 10, p. 1990-1999, 2007. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0487

HU, W. et al. Impact of the polymorphism in vitamin D receptor gene Bsml and the risk of systemic lupus erythematosus: an updated meta-analysis. **Clin Rheumatol.**, v. 35, n. 4, p. 927-34, 2016.. Publicado eletronicamente antes da versão impressa em: 2015 dec. 28. doi: 10.1007/s10067-015-3157-x

IRURETAGOYENA, M. et al. Immune Response Modulation by Vitamin D: Role in Systemic Lupus Erythematosus. **Frontiers in Immunology.**, v. 6, p. 513, 2015. doi:10.3389/fimmu.2015.00513.

IWAKIRI, D. et al. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from toll-like receptor 3. **The Journal of Experimental Medicine.**, v. 206, n. 10, p. 2091-2099, 2009. doi:10.1084/jem.20081761.

JAHANTIGH, D. et al. Association Between Functional Polymorphisms of DNA Double-Strand Breaks in Repair Genes XRCC5, XRCC6 and XRCC7 with the Risk of Systemic Lupus Erythematosus in South East Iran. **DNA and Cell Biology.**, v. 34, n. 5, p. 360-366, 2015. doi:10.1089/dna.2014.2465.

JAMES, J. A. et al. An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. **J Clin Invest.**, v. 100, n. 12, p. 3019-3026, 1997. doi:10.1172/JCI119856.

JAMES, J. A.; ROBERTSON, J. M. Lupus and Epstein-Barr. **Current opinion in rheumatology.**, v. 24, n. 4, p. 383-388, 2012. doi:10.1097/BOR.0b013e3283535801.

KAMEN, D. L. et al. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity Reviews.**, v. 5, n. 2, p. 114-117, 2006.

KAMEN, D. L.; TANGPRICHA, V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. **Journal of Molecular Medicine.**, v. 88, n. 5, p. 441–450, 2010. doi: 10.1007/s00109-010-0590-9.

KHAN, D.; ANSAR AHMED, S. The Immune System Is a Natural Target for Estrogen Action: Opposing Effects of Estrogen in Two Prototypical Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology.**, v. 6, p. 635, 2015. doi:10.3389/fimmu.2015.00635.

KIM, A.; CHONG, B.F. Photosensitivity in cutaneous lupus erythematosus. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.**, v. 29, n. 1, p. 4-11, 2013.

KOIKE, M.; YUTOKU, Y.; KOIKE, A. The Defect of Ku70 Affects Sensitivity to X-Ray and Radiation-Induced Caspase-Dependent Apoptosis in Lung Cells. **Pharmacology.**, v. 75, n. 4, p. 415-420, 2013. doi: 10.1292/jvms.12-0333.

KONGSBAK, M. et al. The Vitamin D Receptor and T Cell Function. **Frontiers in Immunology.**, v. 4, p. 148, 2013. doi:10.3389/fimmu.2013.00148.

KOSMINSKY, S.; MENEZES, R. C.; COELHO, M. R. C. D. Infecção pelo vírus Epstein-Barr em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 52, n. 5, p. 352-355, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302006000500025&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302006000500025&lng=en&nrm=iso)>. acesso on 13 Nov. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302006000500025>.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. Mirbase: Annotating high confidence micrnas using deep sequencing data. **Nucleic Acids Res.**, v. 42, p. D68–D73, 2014.

KUHN, A. et al. Photoprotective effects of a broad-spectrum sunscreen in ultraviolet-induced cutaneous lupus erythematosus: A randomized, vehicle-controlled, double-blind study. **J Am Acad Dermatol.**, v. 64, n. 1, p. 37-48, 2011. doi: 10.1016/j.jaad.2009.12.053.

KUHN, A.; RULAND, V.; BONSMANN, G. Photosensitivity, phototesting, and photoprotection in cutaneous lupus erythematosus. **Lupus.**, v. 19, n. 9, p. 1036-46, 2010. doi: 10.1177/0961203310370344.

KULLING, M. P. et al. Calcitriol-mediated reduction in IFN- $\gamma$  output in T cell large granular lymphocytic leukemia requires vitamin D receptor upregulation. **J Steroid Biochem Mol Biol.** Publicado eletronicamente antes da versão impressa em: 2017 jul. 20. doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.07.009.

KYTTARIS, V.C. Systemic Lupus Erythematosus: From Genes to Organ Damage. **Methods Mol Biol.**, n. 662, p. 265–283, 2010.

LEA, W. W.; LEE, Y. H. The association between the PTPN22 C1858T polymorphism and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis update. **Lupus.**, v. 20, p. 51–57, 2011.

LEE, C-H. et al. Molecular Mechanisms of UV-Induced Apoptosis and Its Effects on Skin Residential Cells: The Implication in UV-Based Phototherapy. **International Journal of Molecular Sciences.**, v. 14, n. 3, p. 6414-6435, 2013. doi:10.3390/ijms14036414.

LUO, X-Y. Y. et al. Vitamin D receptor gene BsmI polymorphism B allele, but not BB genotype, is associated with systemic lupus erythematosus in a Han Chinese population. **Lupus.**, v. 21 p. 53 2012. Publicado eletronicamente antes da versão impressa em: 2011 oct. 17. doi: 10.1177/0961203311422709

MA, W.; WESTMORELAND, J. W.; RESNICK, M. A. Homologous recombination rescues ssDNA gaps generated by nucleotide excision repair and reduced translesion DNA synthesis in yeast G2 cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 110, n. 31, p. E2895–904, 2013. doi:10.1073/pnas.1301676110.

MACLAUGHLIN, J. A.; ANDERSON, R. R.; HOLICK, M. F. Spectral character of sunlight modulates photosynthesis of previtamin D3 and its photoisomers in human skin. **Science.**, v. 216, n. 4549, p. 1001-3, 1982.

MAGALHÃES JÚNIOR, H. M. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Lúpus Eritematoso Sistêmico. PORTARIA Nº 100, DE 7 DE FEVEREIRO DE 2013. 2013.

MAGALHÃES, M.B.; DONADI, E.A.; LOUZADA, JR. P. Manifestações Clínicas do Lúpus Eritematoso Sistêmico: Abordagem Diagnóstica e Terapêutica na Sala de Urgência. Medicina, Ribeirão Preto, **Simpósio: Urgências E Emergências Imunológicas.**, v. 36, p. 409-417, 2003.

MAO, P. et al. Serine/Threonine Kinase 17A Is a Novel p53 Target Gene and Modulator of Cisplatin Toxicity and Reactive Oxygen Species in Testicular Cancer Cells. **J Biol Chim.**, v. 286, p. 19381-19391, 2011.

MAO, S.; HUANG, S. Association between vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI and TaqI polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. **Rheumatol Int.**, v. 34, n. 3, p. 381-8, 2014. Publicado eletronicamente antes da versão impressa em: 2013 nov. 9. doi:10.1007/s00296-013-2898-6.

MARQUES, C. D. L. et al. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 50, n. 1, p. 67-80, 2010. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0482-50042010000100007&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042010000100007&lng=en&nrm=iso)>. access on 30 Oct. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042010000100007>.

MATTICK, J. S.; MAKUNIN, I. V. Non-coding RNA. **Hum Mol Genet.**, v. 15, p. 17-29, 2006.

MENCHON, G. et al. Structure-Based Virtual Ligand Screening on the XRCC4/DNA Ligase IV Interface. **Scientific Reports.** v. 6, p. 22878, 2016. doi:10.1038/srep22878.

MOK, C. C.; LAU, C. S. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Journal of Clinical Pathology.**, v. 56, n. 7, p. 481-490, 2003.

MOLINEROS, J. E. et al. Admixture Mapping in Lupus Identifies Multiple Functional Variants within IFIH1 Associated with Apoptosis, Inflammation, and Autoantibody Production. **PLoS Genet.**, v. 9, n. 2, p. e1003222, 2013. doi:10.1371/journal.pgen.1003222.

MONTICIELO, O. A. et al. Vitamin D and polymorphisms of VDR gene in patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical rheumatology.**, v. 25. 2012. doi: 10.1007/s10067-012-2021-5.

MORAND, G. et al. Insights into Genetic and Epigenetic Determinants with Impact on Vitamin D Signaling and Cancer Association Studies: The Case of Thyroid Cancer. **Frontiers in Oncology.**, v. 4, p. 309, 2014. doi: 10.3389/fonc.2014.00309.

MORTENSEN, U. H.; LISBY, M.; ROTHSTEIN, R. Rad52. **Curr Biol.**, v. 19, p. R676–R677, 2009.

MOSTOWSKA, A. et al. Vitamin D receptor gene BsmI, FokI, ApaI and TaqI polymorphisms and the risk of systemic lupus erythematosus. **Mol Biol Rep.**, v. 40, p. 803–10, 2013.

MOTA, L. M. H. et al. Lúpus induzido por drogas: da imunologia básica à aplicada. **Rev. Bras. Reumatol.** [online]. v. 47, n. 6, p. 431-437, 2007. doi:10.1590/S0482-50042007000600007.

MUMBREKAR, K. D. et al. Polymorphisms in double strand break repair related genes influence radiosensitivity phenotype in lymphocytes from healthy individuals. **DNA Repair (Amst).**, v. 40, p. 27-34, 2016. Publicado eletronicamente antes da versão impressa em: 2016 mar. 4. doi: 10.1016/j.dnarep.2016.02.006.

MUÑOZ-GALVÁN, S. et al. Histone H3K56 Acetylation, Rad52, and Non-DNA Repair Factors Control Double-Strand Break Repair Choice with the Sister Chromatid. **PLoS Genet.**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2013. doi:10.1371/journal.pgen.1003237

MÜNZ, C. Dendritic cells during Epstein Barr virus infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 308, 2014. doi:10.3389/fmicb.2014.00308.

NAKASHIMA, C.A.K. et al. Incidência e aspectos clínico laboratoriais do lúpus eritematoso sistêmico em cidade do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, p. 231-9, 2011.

NEAL J.A.; MEEK K. Choosing the right path: does DNA-PK help make the decision? **Mutation Research**, v. 711, p. 73–86, 2011.

OBERMOSER, G.; PASCUAL, V. The interferon- $\alpha$  signature of systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 19, n. 9, p. 1012-1019, 2010. doi:10.1177/0961203310371161.

O'DRISCOLL, M. et al. DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. **Mol Cell**, v. 8, n. 6, p. 1175-85, 2001.

OH, S. et al. Human LIGIV is synthetically lethal with the loss of Rad54B-dependent recombination and is required for certain chromosome fusion events induced by telomere dysfunction. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 3, p. 1734-1749, 2013. doi:10.1093/nar/gks1326.

OLIVEIRA, L. et al. Dysregulation of antiviral helicase pathways in systemic lupus erythematosus. **Frontiers in Genetics**, v. 5, p. 418, 2014. doi:10.3389/fgene.2014.00418.

OSTANEK, L. et al. PTPN22 1858C > T gene polymorphism in patients with SLE: association with serological and clinical results. **Mol Biol Rep**, v. 41, p. 6195–6200, 2014.

OZAKI, Y. et al. Vitamin-D Receptor Genotype and Renal Disorder in Japanese Patients with Systemic Lupus erythematosus. **Nephron**, v. 85, p. 86-91, 2000.

PARK, Y. et al. Cytoplasmic DRAK1 overexpressed in head and neck cancers inhibits TGF- $\beta$ 1 tumor suppressor activity by binding to Smad3 to interrupt its complex formation with Smad4. **Oncogene**, v. 24;34, n. 39, p. 5037-45, 2015. Publicado eletronicamente antes da versão impressa em: 2014 dec. 22. doi:10.1038/onc.2014.423.

PATSINAKIDIS, N. et al. Suppression of UV-induced damage by a liposomal sunscreen: a prospective, open-label study in patients with cutaneous lupus erythematosus and healthy controls. **Exp Dermatol**, v. 21, n. 12, p. 958-61, 2012. doi:10.1111/exd.12035.

PENG, G. LIN, S. Y. Exploiting the homologous recombination DNA repair network for targeted cancer therapy. **World J Clin Oncol**, v. 2, n. 2, p. 73-79, 2011.

PFEIFER, G. P.; BESARATINIA, A. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. **Photochemical & photobiological sciences**: Official journal of the European Photochemistry

Association and the European Society for Photobiology., v. 11, n. 1, p. 90-97, 2012. doi:10.1039/c1pp05144j.

PIETERSE, E.; VAN DER VLAG, J. Breaking Immunological Tolerance in Systemic Lupus Erythematosus. **Frontiers in Immunology.**, v.5, p. 164, 2014. doi:10.3389/fimmu.2014.00164.

PIROOZMAND, A.; KASHANI, H. H.; ZAMANI, B. Correlation between Epstein-Barr Virus Infection and Disease Activity of Systemic Lupus Erythematosus: a Cross-Sectional Study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP.**, v. 18, n. 2, p. 523-527, 2017. doi:10.22034/APJCP.2017.18.2.523.

PODGORSAK, E. B. Radiation physics for medical physicists. **Springer Science & Business Media.**, 2010.

PONS-ESTEL, G.J. et al. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. **Seminars in arthritis and rheumatism.**, v. 39, p. 257–68, 2010.

POOLE, B. D. et al. Epstein-Barr virus and molecular mimicry in systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity.**, v. 39, n. 1, p. 63-70, 2006. doi:10.1080/08916930500484849.

PRADHAN, V.; BORSE, V.; GHOSH, K. PTPN22 gene polymorphisms in autoimmune diseases with special reference to systemic lupus erythematosus disease susceptibility. **J Postgrad Med.**, v. 56, p. 239-42, 2010.

RAHMAN, A.; ISENBERG, D. A. Systemic lupus erythematosus. **New Engl J Med.**, v. 358, n. 9, p. 29–39, 2008.

REICHLIN, M.; HARLEY, J. B.; LOCKSHIN, M. D. Serologic studies of monozygotic twins with systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism.**, v. 35, p. 457–464, 1992. doi:10.1002/art.1780350416

ROLF, L. et al. Vitamin D effects on B cell function in autoimmunity. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1317, p. 84–91, 2014. doi:10.1111/nyas.12440.

ROTHENBERG, E. et al. Human Rad52-mediated homology search and annealing occurs by continuous interactions between overlapping nucleoprotein complexes. **Proc Natl Acad Sci.**, v.105, n. 51, p. 20274-20279, 2008. doi: 10.1073/pnas.0810317106.

RUSS. V.; HOCHBERG, M. C. The epidemiology of systemic lupus erythematosus In: Dubois´ Lupus erythematosus. Wallace DJ, Hahn BH (eds). Philadelphia: **Lippincott Williams & Wilkins.**, p. 65-83, 2001.

SADEGHI, K. et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. **Eur J Immunol.**, v. 36, n. 2, p. 361-70, 2006.

- SAEED, M. Lupus pathobiology based on genomics. **Immunogenetics.**, v. 69, n. 1, p. 1-12, 2017. doi:10.1007/s00251-016-0961-7.
- SANDRIN-GARCIA, P. et al. Shared and unique gene expression in systemic lupus erythematosus depending on disease activity. **Annals of the New York Academy of Sciences.**, v. 1173, p. 493–500, 2009.
- SANJO, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis. **J Biol Chem.**, v. 44, p. 29066–71, 1998.
- SATO, E. I. et al. Consenso brasileiro para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico (LES). **Revista Brasileira de Reumatologia.**, v. 42, n. 6, p. 362-370, 2002.
- SATO, E. I. Lúpus Eritematoso Sistêmico. In: J. C. Voltarelli (Org.). **Imunologia Clínica na prática Médica.** 2008. cap. 29. p. 651-662.
- SESTAK, A. L. et al. The genetics of systemic lupus erythematosus and implications for targeted therapy. **Annals of the Rheumatic Diseases.**, v. 70, p. i37-i43, 2011.
- SHI, L. et al. Meta-analysis of the correlation between PTPN22 gene polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Asia Pac J Public Health.**, v. 25, p. 22S–29S, 2013.
- SHI, T-Y. et al. RAD52 Variants Predict Platinum Resistance and Prognosis of Cervical Cancer. **PLoS ONE.**, v. 7, n. 11, p. e50461, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0050461
- SLEGEN - International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. **Nat Genet.**, v. 2, p. 204–10, 2008.
- SMYTH, D. J. et al. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. **Nat Genet.**, v. 38, p. 617–9, 2006.
- SOULIOTIS, V. L. et al. Defective DNA repair and chromatin organization in patients with quiescent systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy.**, v. 18, p. 182, 2016. doi:10.1186/s13075-016-1081-3.
- STANFORD, S. M.; RAPINI, N.; BOTTINI, N. Regulation of TCR signalling by tyrosine phosphatases: from immune homeostasis to autoimmunity. **Immunology.**, v. 137, n. 1, p. 1-19, 2012. doi:10.1111/j.1365-2567.2012.03591.x.
- STEVE, P. et al. Linking susceptibility genes and pathogenesis mechanisms using mouse models of systemic lupus erythematosus. **Disease Models and Mechanisms.**, v. 7, p. 1033-1046, 2014. doi: 10.1242/dmm.016451

SULLIVAN, K. et al. Identification of a Small Molecule Inhibitor of RAD52 by Structure-Based Selection. Korolev S, ed. **PLoS ONE.**, v.11, n. 1, p. e0147230, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0147230.

SUMETHKUL, K. et al. AB0682 Lupus nephritis is a significant predictor of vitamin D deficiency in SLE patients. **Annals of the Rheumatic Diseases.**, v. 71, p. 677, 2013.

SUTHERLAND, A. et al. Genomic polymorphism at the interferon-induced helicase (IFIH1) locus contributes to Graves' disease susceptibility. *J Clin Endocrinol Metab.*, v. 92, p. 3338–41, 2007.

SZODORAY, P. et al. The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. **Scand J Immunol.**, v. 68, n. 3, p. 261-9, 2008.

TAN, E. M. et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, v. 25, n. 11, p. 1271-7, 1982.

TOCHHAWNG, L. et al. "Redox regulation of cancer cell migration and invasion". **Mitochondrion.**, v. 13, n. 3, p. 246–53, 2013. doi:10.1016/j.mito.2012.08.002. PMID 22960576.

TSAI, A.G.; LIEBER, M.R. Mechanisms of chromosomal rearrangement in the human genome. **BMC genomics.**, v. 11, n. 1, p. S1, 2010.

TSOKOS, G.C. Systemic lupus erythematosus. **N. E. journal of medicine.**, v. 365, p. 2110–21, 2011.

TULLER, T. et al. Common and specific signatures of gene expression and protein-protein interactions in autoimmune diseases. **Genes Immun.**, v. 14, n. 2, p. 67-82, 2013. doi: 10.1038/gene.2012.55. Epub 2012 Nov 29.

UITTERLINDEN, A. G. et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. **Gene.**, v. 338, n. 2, p. 143-156, 2004.

URAMOTO, K. M. et al. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. **Arthritis Rheum.**, v. 42, n. 1, p. 46-50, 1999.

UVA, L. et al. Cutaneous Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. **Autoimmune Diseases.**, v. 2012 , p. 834291, 2012. doi:10.1155/2012/834291.

VANG, T. et al.. Protein tyrosine phosphatase PTPN22 in human autoimmunity. Review. **Autoimmunity.**, v. 40, n. 6, p. 453-61, 2007.

VELDURTHY, V. Vitamin D, calcium homeostasis and aging. **Bone research.**, v. 4, p. 16041, 2016.

VILÁ, L. M. et al. Association of sunlight exposure and photoprotection measures with clinical outcome in systemic lupus erythematosus. **P R Health Sci J.**, v. 18, n. 2, p. 89-94, 1999.

VILAR, M. J.; SATO, E. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). **Lupus.**, v. 11, p. 528–32, 2002.

VINUESA, C. G., RIGBY, R. J.; YU, D. Logic and extent of miRNA-mediated control of autoimmune gene expression. **International Reviews of Immunology.**, v. 28, p. 112–138, 2009.

VYSE, T.J.; KOTZIN, B.L. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Annu Rev Immunol.**, v. 16, p. 261-92, 1998.

WAKELAND, E. K. et al. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. **Immunity.**, v. 15, p. 397 – 408, 2001.

WANG, K. et al. Role of vitamin D receptor gene Cdx2 and Apa1 polymorphisms in prostate cancer susceptibility: a meta-analysis. **BMC Cancer.**, v. 16, n. 1, p. 674, 2016. doi:10.1186/s12885-016-2722-2.

WANG, Y.; ZHU, J.; DELUCA, H. F. Where is the vitamin D receptor?. **Archives of biochemistry and biophysics.**, v. 523, n. 1, p. 123-133, 2012.

WEENING, J. J. et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. **Kidney Int.**, v. 65, n. 2, p. 521-30, 2004.

WEI, X. et al. Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. **Nat. Genet.**, v. 5, p. 442-446, 2011.

WEIDENBUSCH, M.; KULKARNI, O. P.; ANDERS, H. J. The innate immune system in human systemic lupus erythematosus. **Clinical Science.**, v. 131, n. 8, p. 625-634, 2017. doi:10.1042/CS20160415.

WISCHERMANN, K. UVA radiation causes DNA strand breaks, chromosomal aberrations and tumorigenic transformation in HaCaT skin keratinocytes. **Oncogene.**, v. 27, p. 4269–4280, 2008. Publicado eletronicamente antes da versão impressa em: 2008 mar. 31. doi:10.1038/onc.2008.70.

WÖBKE, T. K.; SORG, B. L.; STEINHILBER, D. Vitamin D in inflammatory diseases. **Front Physiol.**, eCollection 2014. v. 2, n. 5:244, p. 1-20, 2014. doi: 10.3389/fphys.2014.00244.

WRZOSEK, M. et al. Association between Fok I vitamin D receptor gene (VDR) polymorphism and impulsivity in alcohol-dependent patients. **Molecular Biology Reports.**, v. 41, n. 11, p. 7223-7228, 2014. doi:10.1007/s11033-014-3607-6.

WU, J. et al. Identification of substrates of human protein-tyrosine phosphatase PTPN22. **J Biol Chem.**, v. 281, n. 16, p. 11002-10, 2006.

WUSTER, A.; BEHRENS, T. W. Thinking differently about lupus. **eLife.**, v. 5, p. e15352. 2016. doi:10.7554/eLife.15352.

XIAO, X. et al. Vitamin D Deficiency and Related Risk Factors in Patients with Diabetic Nephropathy. **J Int Med Res.**, v. 44, n. 3, p. 673–684, 2016. Publicado eletronicamente antes da versão impressa em: 2018 feb. 4.

XU, L. et al. Genetic Variants in DNA Double-Strand Break Repair Genes and Risk of Salivary Gland Carcinoma: A Case-Control Study. Cotterill S, ed. **PLoS ONE.**, v. 10, n. 6, p. e0128753, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0128753.

YANG, Y. et al. Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans. **Am J Hum Genet.**, v. 80, n. 6, p. 1037-54, 2007. Publicado eletronicamente antes da versão impressa em: 2007 apr. 26.

YIN, M. et al. Genetic variants of the nonhomologous end joining gene LIG4 and severe radiation pneumonitis in nonsmall cell lung cancer patients treated with definitive radiotherapy. **Cancer.**, v. 15;118, n. 2, p. 528-35, 2012. Publicado eletronicamente antes da versão impressa em: 2011 jun. 29. doi: 10.1002/cncr.26214.

ZAHN, S. et al. Enhanced skin expression of melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) in dermatomyositis and related autoimmune diseases. **J Am Acad Dermatol.**, v. 5, p. 988–9, 2011.

ZENEWICZ, L. A. et al. Unraveling the genetics of autoimmunity. **Cell.**, v.140, p. 791–7, 2010.

ZHENG, Y. J. et al. The relationship of vitamin D endocrine system and estrogen receptor expression with bone mineral density in initial systemic lupus erythematosus. [Article in Chinese] **Zhonghua Nei Ke Za Zhi.**, v. 49, n. 4, p. 309-12, 2010.

ZHOU, T. B. et al. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with the risk of systemic lupus erythematosus. **J Recept Signal Transduct Res.**, v. 35, n. 1, p. 8-14, 2015. Publicado eletronicamente antes da versão impressa em: 2014 may. 22. doi: 10.3109/10799893.2014.922577.

## APÊNDICES

### APÊNDICE I

#### C- DADOS CLÍNICOS ATUAIS

#### MEDICAMENTOS EM USO:

OBS.: (Marcar com X na última coluna da direita aqueles utilizados no dia da coleta)

DROGA	DOSE ATUAL
1. Prednisona (5mg, 20 mg)	
2. Micofenolato de mofetil 500 mg	
3. Difosfato de Cloroquina (150 mg, 200 mg)	
4. Hidroxicloroquina 400 mg (REUQUINOL)	
5. Ciclofosfamida	
6. Azatioprina 50 mg	
7. Talidomida	
8. Outras:	
Captopril 25 mg	
Enalapril 10 mg	
Losartana potássica 50 mg	
Hidroclorotiazida 25 mg	
Atorvastatina	
Sinvastatina (20 mg, 40 mg)	

#### Critérios de Atividade:

#### SLEDAI

SLEDAI: Score: \_\_\_\_\_

Convulsão:	8 ( )	Artrite:	4 ( )	Úlceras mucosas:	2 ( )
Psicose:	8 ( )	Miosite:	4 ( )	Pleurite:	2 ( )
Sd Mental Org.	8 ( )	Cilindros:	4 ( )	Pericardite:	2 ( )
Alt. Visual:	8 ( )	Hematúria:	4 ( )	Complemento:	2 ( )
Alt. Nervos cranianos	8 ( )	Proteinúria:	4 ( )	Anti-DNA:	2 ( )
Cefaléia:	8 ( )	Piúria:	4 ( )	Febre:	1 ( )
AVC:	8 ( )	Alopecia:	2 ( )	Plaquetopenia	1 ( )
Vasculite:	8 ( )	Rash:	2 ( )	Leucopenia	1 ( )

## EXAMES LABORATORIAIS

<b>Hemograma:</b> Hb/Ht = Leuc = Bast = Seg = Linf = Plaquetas =	<b>Sumário de urina:</b> Proteínas = Hemoglobina = Glicose = Piócitos = Cilindros =
<b>Uréia</b> <b>Creatinina =</b>	<b>Anti-DNA =</b>
<b>VSH =</b>	
<b>PCR =</b>	
<b>Relação albumina/creatinina na urina e/ou Proteinúria de 24 horas =</b>	<b>C3=</b> <b>C4 =</b> <b>CH50 =</b>

**CLEARENCE DA CREATININA = \_\_\_\_\_**

**RESULTADO DA BIÓPSIA/ DATA:**

---



---



---

**CLASSIFICAÇÃO:**

- Classe I – Nefrite Lúpica mesangial mínima**
- Classe II – Nefrite Lúpica mesangial proliferativa**
- Classe III – Nefrite Lúpica focal (<50% dos glomérulos)**
  - III A – com lesões ativas
  - III A/C – com lesões ativas e crônicas
  - III C – com lesões crônicas
- Classe IV – Nefrite Lúpica Difusa (> 50% dos glomérulos)**
  - IV segmentar            IV difusa
  - IV A – com lesões ativas
  - IV A/C – com lesões ativas e crônicas
  - IV C – com lesões crônicas
- Classe V – Nefrite membranosa**
- Classe VI – Nefrite esclerosante avançada (90%) de esclerose sem atividade residual)**

<b>ATIVIDADE / CRONICIDADE*</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b><u>Índice de atividade (0 a 24)</u></b>				
Hipercelularidade glomerular				
Exsudato de leucócitos				
Necrose fibrinoide / cariorrexis				
Crescentes celulares				
Trombos hialinos				
Inflamação túbulo-intersticial				
Pontuar individualmente de 0 a 3 (ausente, leve, moderada, grave) Necrose, cariorrexis e crescentes celulares têm peso 2				
<b>TOTAL</b>				
<b><u>Índice de cronicidade (0 a 12)</u></b>				
Lesões glomerulares				
Esclerose glomerular				
Crescentes fibróticos				
Lesões túbulo –intersticiais				
Atrofia tubular				
Fibrose intersticial				
<b>TOTAL</b>				

## APÊNDICE II

## UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

## CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa: "ESTUDO DE FATORES GENÉTICOS ENVOLVIDOS NA PREDISPOSIÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DE NEFRITE EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO", que está sob a responsabilidade da pesquisadora: NADJA MARIA JORGE ASANO, endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Universidade Federal de Pernambuco - Hospital das Clínicas, 3º. andar - CEP 50.670-901 - Recife-PE, Tel.: 87662698 (inclusive ligações a cobrar), e-mail: nadjaasano@hotmail.com. Também participam desta pesquisa: Dra. Paula Sandrin-Garcia - Tel: 96871176; Dra. Nadja Maria Jorge Asano -Tel: 87662698; Dra. Lucila Maria Valente Lopes -Tel: 99896661; Camila Gonçalves de Santana -Tel: 99187038; Juliana Teti Mayer-Tel: 98388508; Claudia Coimbra César de Albuquerque - Tel: 92722233; Dra. Jaqueline de Azevedo Silva -Tel: 92244160; Catarina Addobbati Jordão Cavalcanti -Tel: 92244489; Suelen Cristina de Lima – Tel: 99325801; José Eduardo Adelino Silva – Tel: 88278436.

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em fazer parte do estudo, rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

Lúpus Eritematoso Sistêmico é uma doença reumatológica que pode prejudicar as defesas do organismo levando a inflamação das juntas, da pele, do coração, do pulmão, do sistema nervoso, do sangue e dos rins. A inflamação dos rins nesta doença é chamada de nefrite lúpica e este estudo pretende investigar pacientes com esta nefrite. Serão coletados cerca de 10 ml de sangue que será encaminhado para o Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE) para realização dos exames laboratoriais.

Os possíveis riscos que este tipo de estudo pode trazer são: constrangimento durante as respostas das questões da entrevista e desconforto (dor/mancha roxa) durante a coleta do material de sangue. Para minimizar os riscos de constrangimento, a pesquisadora explicará cuidadosamente a importância da coleta, os possíveis desconfortos durante a mesma, considerados leves e temporários e caso persistam, a coleta será interrompida.

Como benefício direto, a entrevista proporcionará ao participante uma melhor reflexão sobre a sua própria doença, à medida que for sendo esclarecidas as suas dúvidas. Como benefício indireto, este trabalho pretende um maior aprofundamento dos conhecimentos a

respeito desta doença e um melhor entendimento de como ocorre o desenvolvimento da mesma.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa através da ficha de avaliação ficarão armazenados em pastas de arquivo, sob a responsabilidade da pesquisadora, no endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Hospital das Clínicas, pelo período de 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

---

Nadja Maria Jorge Asano

#### **CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)**

Eu, \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo "ESTUDO DE FATORES GENÉTICOS ENVOLVIDOS NA PREDISPOSIÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DE NEFRITE EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO", como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o

meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Local e data \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_



Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar.

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura: