

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

André de Souza Cavalcanti

POLIMORFISMOS DOS GENES *HLA-G*, *IL-10*, *TNF* E PERFIL DE CITOCINAS EM
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO DE INÍCIO NA INFÂNCIA

RECIFE
2016

André de Souza Cavalcanti

POLIMORFISMOS DOS GENES *HLA-G*, *IL-10*, *TNF* E PERFIL DE CITOCINAS EM
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO DE INÍCIO NA INFÂNCIA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

RECIFE

2016

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- C376p Cavalcanti, André de Souza.
Polimorfismos dos genes HLA-G, IL-10, TNF e perfil de citocinas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância / André de Souza Cavalcanti. - Recife: [s.n.], 2016.
108 p.: il., tab., 30 cm.
- Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2016.
Orientadora: Norma Lucena Cavalcanti.
1. Lúpus Eritematoso Sistêmico - genética. 2. Citocinas. 3. Antígenos HLA-G – genética. 4. Antígenos HLA-G - imunologia. 5. Polimorfismo Genético. I. Silva, Norma Lucena Cavalcanti Licínio da. II. Título.

CDU 616.5-002.5

André de Souza Cavalcanti

POLIMORFISMOS DOS GENES *HLA-G*, *IL-10*, *TNF* E PERFIL DE CITOCINAS EM
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO DE INÍCIO NA INFÂNCIA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data de aprovação: 31 de outubro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva (Orientadora)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos (Membro interno)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dra. Haiana Charifker Schindler (Membro interno)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Bartolomeu Acioli dos Santos (Membro externo)
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta (Membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

À Fernanda, minha esposa, pelo amor e apoio incondicional durante esta jornada. O seu apoio foi pedra fundamental na construção deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva, que foi através da sua orientação desde o final da década de 1990 como seu estudante de iniciação científica, que dei meus primeiros passos na ciência. Agradeço os anos de aprendizado, convívio e principalmente sua valiosa orientação.

À Dra. Angela Luzia Branco Pinto Duarte, chefe do Serviço de Reumatologia do HC-UFPE, pela confiança em minha pessoa ao transferir a responsabilidade pelo ambulatório de Reumatologia Pediátrica do HC-UFPE.

À Dra. Zelina Barbosa Mesquita, responsável pelo ambulatório de Reumatologia Pediátrica do IMIP, a qual prontamente aceitou em participar deste trabalho com a inclusão dos seus pacientes.

Aos meus pais, Catarina e Fernando, que tanto fizeram e fazem para o meu crescimento pessoal e profissional. Exemplos a serem seguidos.

Aos colegas do Laboratório de Imunogenética do CPqAM, em especial Renata, Renan, Rossana, Ester, Laís, Sávio e Fernanda, pelos ensinamentos e ajuda no laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e familiares, pela compreensão durante minha ausência em várias oportunidades do nosso convívio, que não foram poucas.

E por último e não menos importante, aos pacientes e seus familiares, que sempre demonstraram imensa satisfação em participar deste trabalho. Devo muito a vocês meu aprendizado sobre os reais problemas da vida.

CAVALCANTI, André de Souza. **Polimorfismos dos genes *HLA-G*, *IL-10*, *TNF* e perfil de citocinas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância**. 2016. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

RESUMO

Lúpus eritematoso sistêmico de início na infância (LESi) é uma doença autoimune crônica que apresenta fenótipo clínico agressivo. Citocinas pró-inflamatórias participam da patogênese da doença. Neste contexto, determinamos citocinas Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF), Th2 (IL-4), Th17 (IL-17A, IL-6) e Treg (IL-10) em pacientes com LESi e grupo controle, assim como avaliamos polimorfismos na região promotora dos genes *IL-10*, *TNF* e na região 3' não traduzida do gene *HLA-G*. Também determinamos concentração plasmática da proteína HLA-G. Conduzimos estudo caso-controle com 51 pacientes com LESi; 10 pacientes participaram de estudo longitudinal; amostra de sangue foi coletada no mesmo paciente com doença ativa e após com doença inativa ou vice-versa. Pacientes apresentaram aumento de IL-6 (P=0.0002) e IL-10 (P=0.0002) quando comparado com grupo controle. Pacientes com doença ativa apresentaram níveis aumentados de IL-6 e IL-10 do que pacientes com doença inativa (P=0.001 e P=0.014, respectivamente) e grupo controle (P<0.0001 e P<0.0001, respectivamente). No estudo longitudinal, níveis aumentados de IL-6 (P=0.022), IL-10 (P=0.013) e IL-17A (P=0.041) foram observados durante doença ativa em relação à doença inativa. Nenhuma diferença significativa nas frequências genéticas nos genes estudados foram encontradas entre pacientes e controle. No entanto, o genótipo 14 pb Del/Del do *HLA-G* apresentou associação significativa com nefrite lúpica (OR=8.00, IC 95%=1.57-40.65, P=0.006) e o alelo -863 A do *TNF* com serosite (OR=4.17, IC 95%=1.24-13.98, P=0.027). Em relação à expressão do HLA-G, não foi observada diferença entre os grupos. Ainda assim, pacientes com manifestações hematológicas apresentaram menor concentração do HLA-G quando comparado com pacientes sem manifestações hematológicas (P=0.013). IL-6, IL-10 e IL-17A apresentam papel importante na patogênese do LESi; já o HLA-G pode estar envolvido na patogênese da doença. Polimorfismos nos genes estudados não apresentaram associação com susceptibilidade ao LESi.

Palavras-chaves: Lúpus Eritematoso Sistêmico de Início na Infância, Citocinas, Antígenos HLA-G, Polimorfismo Genético.

CAVALCANTI, André de Souza. **Polymorphisms of *HLA-G*, *IL-10*, *TNF* genes and cytokine profile in childhood-onset systemic lupus erythematosus patients.** 2016. Thesis (Doctoral in Biosciences and Biotechnology for Health) – Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2016.

ABSTRACT

Childhood-onset systemic lupus erythematosus (cSLE) is a chronic autoimmune disease which exhibits an aggressive clinical phenotype. Pro-inflammatory cytokines are involved in disease pathogenesis. In this context, we determined plasma levels of Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF), Th2 (IL-4), Th17 (IL-17A, IL-6), and Treg (IL-10) cytokines in cSLE patients and healthy controls, and we evaluated polymorphisms at promoter region of the *IL-10* and *TNF* genes and at the 3' untranslated region of *HLA-G* gene. We also determined plasmatic concentration of HLA-G protein. We conducted a case-control study with 51 cSLE patients; 10 cSLE patients participated in a longitudinal follow-up study; blood sample was collected from the same patient during active and inactive disease or vice-versa. cSLE patients had higher IL-6 (P=0.0002) and IL-10 (P=0.0002) levels than healthy controls. Patients with active disease had higher IL-6 and IL-10 levels than patients with inactive disease (P=0.001 and P=0.014, respectively) and the control group (P<0.0001 and P<0.0001, respectively). In the longitudinal study, IL-6 (P=0.022), IL-10 (P=0.013), and IL-17A (P=0.041) levels were significantly higher during active than inactive disease. No significant difference in genetic frequencies of the studied genes was observed between patients and control group. However, the 14 bp Del/Del genotype (OR=8.00, 95% CI=1.57–40.65, P=0.006) showed an association with lupus nephritis and the *TNF* -863 A allele with serositis (OR=4.17, CI 95%=1.24-13.98, P=0.027). Regarding HLA-G expression, no significant difference was observed between the groups. However, patients with hematological manifestations showed a lower plasma concentration of HLA-G than patients with no hematological manifestations (P=0.013). IL-6, IL-10 and IL-17A play an important role in cSLE pathogenesis; on the other hand, HLA-G may be involved in disease pathogenesis. Polymorphisms in the studied genes showed no association with cSLE susceptibility.

Keywords: Childhood-onset Systemic Lupus Erythematosus, Cytokines, HLA-G Antigens, Genetic Polymorphism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Visão geral da patogênese do lúpus eritematoso sistêmico	21
Figura 2	Vias imunológicas e loci de susceptibilidade relacionados com a patogênese do LES	23
Quadro 1	Genes e loci de susceptibilidade ao LES envolvidos em vias imunológicas e compartilhados com outras doenças autoimunes	27
Figura 3	Isoformas de HLA-G geradas pelo processamento alternativo do RNAm do gene <i>HLA-G</i>	30
Figura 4	Sítios polimórficos observados na região 3' não traduzida do gene <i>HLA-G</i> que podem influenciar a expressão do HLA-G	32
Figura 5	Rede de citocinas presente no LES	34
Figura 6	Gene da IL-10 com visualização dos polimorfismos na região promotora	36
Figura 7	Gene do TNF com visualização dos polimorfismos na região promotora	38
Figura 8	Perfil de citocinas Th1, Th2, Th17 e Treg em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância (com doença ativa e inativa) e grupo controle	54
Figura 9	Concentração plasmática de HLA-G solúvel nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância, com e sem envolvimento de manifestações clínicas	65

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com LESi incluídos no estudo 51
- Tabela 2** Comparação da concentração plasmática das citocinas entre pacientes com LESi e grupo controle 52
- Tabela 3** Estudo de seguimento longitudinal em 10 pacientes em dois momentos diferentes: doença ativa e doença inativa 55
- Tabela 4** Correlações das citocinas com SLEDAI-2K em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância 56
- Tabela 5** Frequências alélicas e genótípicas dos cinco sítios polimórficos (-1031 T>C, -863 C>A, -857 C>T, -308 G>A, e -238 G>A) encontrados na região promotora do *TNF* e dos dois sítios polimórficos (-1082 G>A e -819 C>T) encontrados na região promotora do *IL-10* em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância e grupo controle. Probabilidade de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg também é mostrado 57
- Tabela 6** Frequência haplotípica da região promotora do gene *TNF* em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico de início na infância e grupo controle 59
- Tabela 7** Frequência haplotípica da região promotora do gene *IL-10* em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico de início na infância e grupo controle 60
- Tabela 8** Frequências alélicas e genótípicas dos oito sítios polimórficos (14 pb Ins>Del, +3003 T>C, +3010 C>G, +3027 C>A, +3035 C>T, +3142 G>C, +3187 G>A e +3196 G>C) encontrados na região 3' não traduzida em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância e grupo controle. Probabilidade de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg também é mostrado 62

Tabela 9 Associações dos haplótipos na região 3' não traduzida do *HLA-G* com manifestações clínicas e laboratoriais dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância (regressão logística univariada) 64

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ACR	Colégio Americano de Reumatologia
Anti-dsDNA	Anticorpo anti-DNA de fita dupla
APCs	Células apresentadoras de antígenos
BCR	Receptor de célula B
BLys	Estimulador de linfócitos B
Célula LE	Célula lúpus eritematoso
Células NK	Células <i>Natural Killer</i>
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
EBV	Vírus Epstein-Barr
FAN	Fator anti-núcleo
GWAS	Estudos de Associação Ampla do Genoma
HC-UFPE	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
HLA	Antígeno leucocitário humano
HLA-G	Antígeno leucocitário humano G
ICs	Imunocomplexos
IFN	Interferon
IFN- α	Interferon alfa
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
ILT2	<i>Immunoglobulin like transcript</i>
KIR2DL4	<i>Killer cell immunoglobulin like receptor</i>
IMIP	Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira
<i>IRAK1</i>	Quinase 1 associada ao receptor da IL-1

<i>IRF5</i>	Gene do fator regulador do IFN 5
<i>IRF7</i>	Gene do fator regulador do IFN 7
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LESa	Lúpus eritematoso sistêmico de início no adulto
LESi	Lúpus eritematoso sistêmico de início na infância
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
pb	Pares de base
<i>PTPN22</i>	Proteína tirosina fosfatase não receptor tipo 22
RNAm	RNA mensageiro
sHLA-G	Antígeno leucocitário humano G solúvel
SLICC	<i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics</i>
SNPs	Polimorfismos de base única
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor tipo 1 do TNF
TNFR2	Receptor tipo 2 do TNF
<i>TNFAIP3</i>	TNF proteína induzida 3
<i>TNPI1</i>	proteína 1 que interage com <i>TNFAIP3</i>
3'UTR	Região não traduzida

LISTA DE SÍMBOLOS

pH	potencial hidrogeniônico
<i>g</i>	unidade de aceleração
°C	graus Celsius
mM	milimolar
μL	microlitro
μM	micromolar
pmol	picomol
ng	nanograma
μg	micrograma
mL	mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Lúpus eritematoso sistêmico	17
1.2 Aspectos históricos do LES	18
1.3 Manifestações clínicas e critérios de classificação	18
1.4 Epidemiologia	19
1.5 Patogênese do LES	21
1.5.1 Fatores ambientais	22
1.5.2 Fatores hormonais e sexo	22
1.5.3 Fatores imunológicos	23
1.5.4 Fatores genéticos e epigenética	26
1.6 HLA-G	30
1.6.1 HLA-G no LES	33
1.7 Perfil de citocinas no LES	34
1.7.1 TGF- β	35
1.7.2 IL-10	35
1.7.3 TNF	38
1.7.4 IL-6	40
1.7.5 IL-17	40
2 JUSTIFICATIVA	42
3 OBJETIVOS	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Desenho e população do estudo	44
4.2 Manifestações clínicas e laboratoriais	45

4.3 Atividade da doença	45
4.4 Separação de células periféricas mononucleares	46
4.5 Extração de DNA genômico	46
4.6 Genotipagem da 3'UTR do gene <i>HLA-G</i>	46
4.7 Genotipagem da região promotora do gene <i>TNF</i>	47
4.8 Genotipagem da região promotora do gene <i>IL-10</i>	47
4.9 Quantificação de sHLA-G	48
4.10 Determinação do perfil de citocinas	49
4.11 Análise estatística (análise dos dados de polimorfismos genéticos, citocinas, sHLA-G e variáveis clínicas)	49
5 RESULTADOS	51
5.1 Perfil clínico, laboratorial e demográfico dos pacientes com LESi	51
5.2 Perfil de citocinas	53
5.3 Polimorfismos na região promotora do gene <i>TNF</i>	57
5.4 Polimorfismos na região promotora do gene <i>IL-10</i>	60
5.5 Polimorfismos na 3'UTR do gene <i>HLA-G</i>	61
5.6 Expressão do HLA-G solúvel	62
6 DISCUSSÃO	67
6.1 Perfil de citocinas e polimorfismos do <i>TNF</i> e <i>IL-10</i>	67
6.2 Polimorfismos e expressão do HLA-G	73
6.3 Limitação do estudo	77
7 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICE A- FICHA CLÍNICA – GRUPO CONTROLE	94

APÊNDICE B- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS MENORES DE 18 ANOS	95
APÊNDICE C- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS MAIORES DE 18 ANOS	97
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HC- UFPE	99
ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CPqAM	103
ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO IMIP	105
ANEXO D – ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (SLEDAI-2K)	106
ANEXO E – ARTIGO SUBMETIDO PARA BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH	107
ANEXO F – ARTIGO SUBMETIDO PARA HLA	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lúpus eritematoso sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune complexa, poligênica, com envolvimento de ambos os componentes do sistema imune, tanto a imunidade inata quanto a adaptativa, na sua patogênese. Apresenta acometimento de todos os órgãos e sistemas, com manifestações clínicas heterogêneas e amplo espectro de apresentação, desde formas leves da doença (rash cutâneo, artrite não erosiva e linfadenopatia) até manifestações graves e potencialmente fatais, tais como nefrite lúpica, lúpus neuropsiquiátrico, manifestações hematológicas e síndrome do anticorpo antifosfolípide (TSOKOS, 2011).

Diferente de outras doenças reumáticas na infância, como artrite idiopática juvenil a qual difere consideravelmente da artrite reumatoide do adulto (KAHN, 2012), o lúpus eritematoso sistêmico de início na infância (LESi) é essencialmente a mesma doença tal como no adulto (PERFUMO; MARTINI, 2005; SILVA; AVCIN; BRUNNER, 2012) com as mesmas manifestações clínicas e laboratoriais, no entanto com diferenças na frequência e gravidade dessas manifestações (MINA; BRUNNER, 2010, 2013). Em recente revisão sistemática da literatura, os autores sugerem 18 anos como idade máxima para o diagnóstico de LESi (SILVA; AVCIN; BRUNNER, 2012). Estima-se que LESi é observado entre 10% a 20% de todos os pacientes com LES e é raro o diagnóstico antes dos 5 anos de idade (BRUNNER; HUGGINS; KLEIN-GITELMAN, 2011).

Já está bem estabelecido através de estudos de coorte que compararam LES de início na infância com LES de início no adulto (LESa), que LESi apresenta fenótipo mais grave e maior acometimento renal, neuropsiquiátrico e hematológico (FONT et al., 1998; TUCKER et al., 2008). Além disso, essas crianças e adolescentes com LESi apresentam maior escore de atividade da doença ao diagnóstico, e durante seguimento também apresentam maior atividade da doença, maior dano e mortalidade quando comparados com séries de adultos (BRUNNER et al., 2008; TUCKER et al., 2008). As principais causas de morte em LESi incluem doença renal, lúpus neuropsiquiátrico, surto grave da doença e infecções (GONZALEZ et al., 2005; HUANG et al., 2010). Nas últimas décadas, a taxa de sobrevida tem aumentado significativamente para o LESi de forma semelhante que

aconteceu com o LESa (VON SCHEVEN; BAKKALOGLU, 2009). Numa coorte mista de crianças e adultos de etnia chinesa, a taxa de sobrevivência em 5 anos foi de 90%, em 10 anos de 86% e em 15 anos de 79% (CHEN et al., 2008). Comparado com crianças saudáveis, pacientes com LESi apresentaram pior avaliação da qualidade de vida relacionada à saúde principalmente nos domínios físico e psicossocial (BRUNNER et al., 2009).

Para esta tese consideramos a denominação de LES como termo genérico da doença, o qual inclui todos os pacientes (tanto a faixa etária pediátrica quanto os adultos). Já os termos LESa e LESi, referem-se ao LES de início no adulto e LES de início na infância, respectivamente.

1.2 Aspectos históricos do LES

A palavra lúpus (do latim, lobo) foi originalmente atribuída a Rogerius, cirurgião da Escola de Salerno no século XIII, que examinando seus pacientes descreveu uma doença com ulcerações na face a qual apresentava semelhança com lobo. Em seguida Cazenave, dermatologista francês, adicionou a palavra eritematoso a lúpus devido as características do rash. Kaposi, dermatologista húngaro, descreveu as lesões aguda e crônica na pele dos pacientes com lúpus eritematoso. No final do século XIX, Sir William Osler na Universidade Johns Hopkins associou falência renal em mulheres jovens com o rash e foi o primeiro a descrever o comportamento sistêmico da doença, assim como recidivas e remissões do LES. O século XX esteve associado com vários avanços na doença. Hargraves descreveu o fenômeno da célula do lúpus eritematoso (célula LE), Friou o fator anti-núcleo (FAN) e Tan identificou anticorpo anti-DNA de fita dupla (anti-dsDNA). Essas descobertas auxiliaram o médico a identificar precocemente os pacientes com LES, particularmente àqueles com manifestações atípicas da doença (KLEI-GITELMAN; LANE, 2016).

1.3 Manifestações clínicas e critérios de classificação

O diagnóstico de LES é bastante desafiador, uma vez que os pacientes apresentam ampla diversidade de manifestações clínicas, que aparecem de forma aguda ou insidiosa. Por esse motivo, o LES é considerado o protótipo de doença

inflamatória multissistêmica. A complexidade da doença justifica a dificuldade do diagnóstico numa fase precoce. Os sintomas constitucionais mais comuns são febre, fadiga, perda de peso e linfadenopatia. O envolvimento cutâneo é frequente e uma das lesões mais reconhecidas no LES é o rash malar ou em “asa de borboleta”. Outras manifestações cutâneas incluem vasculite, lúpus bolhoso, lúpus discoide, paniculite lúpica e fenômeno de Raynaud. Artrite não erosiva e artralgia são manifestações comuns na apresentação da doença. Nefrite lúpica é uma manifestação bem conhecida no LES e constitui um dos principais determinantes de morbimortalidade nos pacientes com a doença (TANZER et al., 2013). O lúpus neuropsiquiátrico compreende diversas síndromes neurológicas, que envolve tanto o sistema nervoso central quanto o periférico, além de manifestações psiquiátricas. As mais comuns são cefaleia, convulsões, doença cerebrovascular, coreia, disfunção cognitiva e psicose. As principais manifestações hematológicas são anemia hemolítica, leucopenia e trombocitopenia. Uma variedade enorme de autoanticorpos, principalmente contra antígenos nucleares, está associada com LES. Dentre esses, os mais encontrados são anti-dsDNA e anti-nucleossomo, os quais estão associados com nefrite lúpica. Outros autoanticorpos, como os antifosfolípidos estão associados com trombose e perda fetal, caracterizando a síndrome do anticorpo antifosfolípide.

A partir dessas manifestações clínicas e laboratoriais, critérios para classificação dos indivíduos com LES foram estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) em 1971 e sua última revisão ocorreu em 1997 (HOCHBERG, 1997). Recentemente, o grupo *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) publicou nova proposta de critérios de classificação para pacientes com LES (PETRI et al., 2012). Embora ambos os critérios foram inicialmente validados para LESa, estudos com aplicação desses critérios em coortes de pacientes com LESi também determinaram especificidade e sensibilidade na faixa etária pediátrica (SAG et al., 2014). Para o presente estudo, os pacientes foram classificados de acordo com os critérios do ACR de 1997.

1.4 Epidemiologia

O LES é uma doença ubíqua, com descrição em todos os continentes, no entanto apresenta divergência na incidência e prevalência entre os diferentes países (PETRI, 2002; PONS-ESTEL et al., 2008). Para LESa, a sua prevalência mundial

varia entre 20 a 70 casos por 100.000 habitantes e acredita-se que está aumentando, uma vez que o diagnóstico está sendo feito mais precocemente e a sobrevivência da doença aumentou (PONS-ESTEL et al., 2008). No Brasil, existem apenas dois estudos epidemiológicos. No primeiro, realizado no ano de 2000 na cidade de Natal, foi encontrada incidência de 8,7 casos novos por 100.000 habitantes/ano (VILAR; RODRIGUES; SATO, 2003). Já no segundo, realizado na cidade de Cascavel (região Sudeste), foi encontrada incidência de 4,8 casos novos por 100.000 habitantes/ano (NAKASHIMA et al., 2011). Essa diferença na incidência entre os dois estudos acima, pode ser atribuída pela maior frequência de radiação ultravioleta na cidade de Natal devido a sua localização na região Nordeste do Brasil, quando comparado com a cidade de Cascavel (NAKASHIMA et al., 2011).

Através do *MEDICAID*, sistema de saúde dos Estados Unidos para famílias de baixa renda, estimou-se incidência anual de LESi de 2,22 casos por 100.000 crianças e prevalência de 9,73 casos por 100.000 crianças entre os 3 e 18 anos de idade (MINA; BRUNNER, 2013). Em artigo de revisão sobre incidência e prevalência de LESi, nove estudos descreveram incidência de LESi de 0,36 a 2,5 por 100.000 indivíduos e cinco estudos descreveram prevalência de 1,89 a 25,7 por 100.000 indivíduos (PINELES et al., 2011). Os estudos incluíram dados da América do Norte, Europa e Ásia. Não existem dados epidemiológicos referente ao LESi na população brasileira.

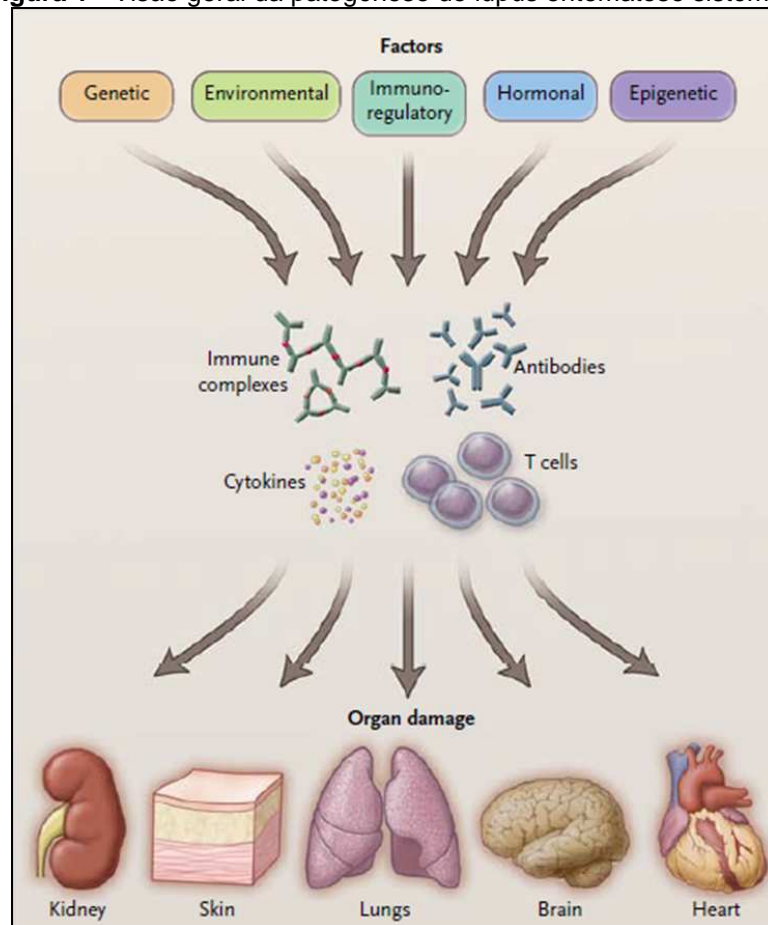
Independente da faixa etária, pacientes de etnia africana, asiática e hispânica, ou seja, não-caucasianos quando comparados com caucasianos, além de apresentarem maior prevalência da doença, também apresentam ao diagnóstico LES mais grave e com maior envolvimento de órgãos e sistemas, além de maior dano cumulativo em longo prazo (HIRAKI et al., 2009; SHAPIRA; AGMON-LEVIN; SHOENFELD, 2010).

Tradicionalmente, o LES é conhecido por acometer mulheres em idade fértil. A predominância do sexo feminino, numa relação de 9 mulheres para 1 homem, indica importante efeito do hormônio estrogênio no desenvolvimento da doença (RAHMAN; ISENBERG, 2008). Na infância, em que o efeito desse hormônio é mínimo, a relação entre os sexos feminino e masculino é de 4:3 (MINA; BRUNNER, 2010).

1.5 Patogênese do LES

Embora o LES tenha sido descrito há mais de 100 anos, sua etiologia ainda não foi completamente esclarecida. Trata-se de doença complexa e multifatorial, com interação de diversos fatores, entre esses ambientais, hormonais e imunológicos, num indivíduo geneticamente predisposto para o desenvolvimento da doença (Figura 1) (RAHMAN; ISENBURG, 2008; TSOKOS, 2011).

Figura 1 - Visão geral da patogênese do lúpus eritematoso sistêmico



Fonte: Tsokos (2011).

Nota: Fatores genéticos, ambientais, imunológicos, hormonais e epigenéticos que agem sequencialmente ou simultaneamente no sistema imune. A ação desses fatores resulta na formação de autoanticorpos, imunocomplexos, células T autorreativas e citocinas inflamatórias que iniciam inflamação e consequente dano em vários órgãos. Mais detalhes no texto.

1.5.1 Fatores ambientais

A contribuição do meio ambiente é evidente no desenvolvimento da doença, uma vez que existe divergência na concordância de LES entre gêmeos monozigóticos (RHODES; VYSE, 2008). Alguns gatilhos têm sido relacionados no desencadeamento da doença. Exposição à radiação ultravioleta é um conhecido fator de piora clínica do LES, devido à indução de apoptose nos queratinócitos com liberação de antígenos nucleares e subsequente produção de autoanticorpos (CASCIOLA-ROSEN; ANHALT; ROSEN, 1994; LEHMANN et al., 1990). O vírus Epstein-Barr (EBV) também vem sendo responsável pelo desencadeamento do LES. Um estudo caso-controle envolvendo crianças e adultos jovens portadores de LES demonstrou maior soroprevalência de anticorpos anti-EBV e carga viral quando comparado com grupo controle (JAMES et al., 1997). Recente revisão sistemática com meta-análise também demonstrou maior soroprevalência para EBV nos pacientes com LES (HANLON et al., 2014). Mimetismo molecular entre antígeno nuclear 1 do EBV e autoantígeno Ro também sugere a contribuição do EBV no desenvolvimento do LES (CRISPÍN et al., 2010).

1.5.2 Fatores hormonais e sexo

Embora homens também possam desenvolver LES, a doença afeta predominantemente mulheres em idade reprodutiva, o que sugere importante papel dos hormônios sexuais e efeitos de genes localizados no cromossomo X. Apesar dos possíveis efeitos dos hormônios sexuais no LES, não existe associação entre sexo e mortalidade ou atividade da doença nos pacientes com LES (MURPHY; ISENBERG, 2013).

O estrogênio estimula a maturação e seleção de células B e T autorreativas e produção de autoanticorpos (PENNELL; GALLIGAN; FISH, 2012). A prolactina estimula a produção da interleucina-6 (IL-6), do interferon (IFN) alfa e gama (SHELLY; BOAZ; ORBACH, 2012).

Observações de que a incidência de LES é alta em homens com a síndrome de Klinefelter (47, XXY) e baixa em mulheres com a síndrome de Turner (45, XO) sugerem efeito de dose do cromossomo X na susceptibilidade ao LES (WECKERLE; NIEWOLD, 2011). A síndrome de Klinefelter apresenta frequência 14 vezes maior

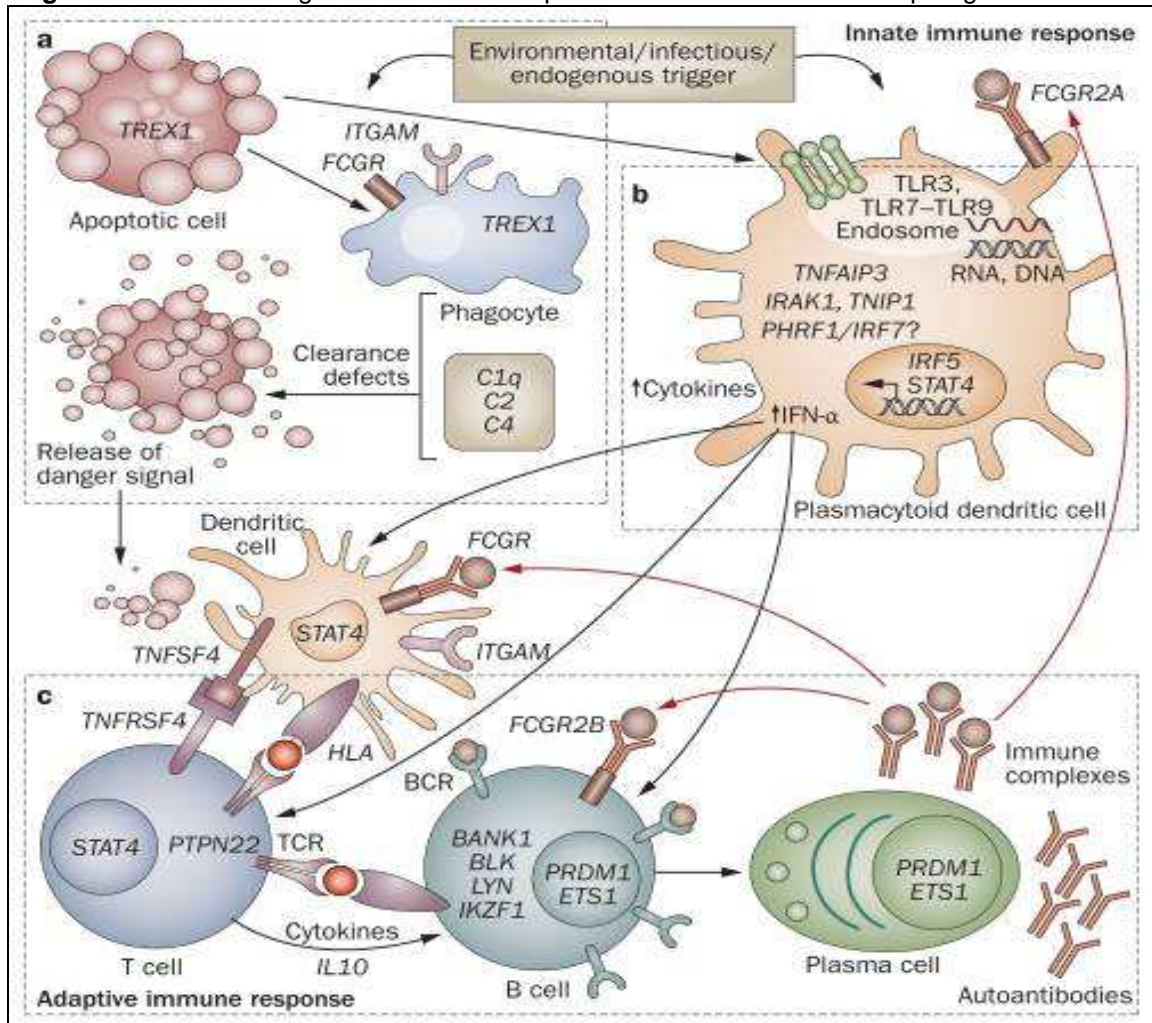
em homens portadores de LES quando comparado com homens saudáveis (SCOFIELD et al., 2008).

1.5.3 Fatores imunológicos

O início da doença depende de gatilho proveniente do meio ambiente num indivíduo geneticamente predisposto. Subsequentemente, ocorre uma resposta imune desregulada com ativação da imunidade inata resultando na produção de citocinas, as quais tornam o microambiente ideal para ativação da resposta imune adaptativa, com posterior produção de autoanticorpos patogênicos e formação de imunocomplexos (ICs). A deposição de ICs num determinado tecido ocasiona atividade inflamatória local e dano em órgão alvo, etapa final do LES. A Figura 2 exemplifica os vários componentes do sistema imune inato e adaptativo envolvidos na patogênese da doença.

A origem dos autoantígenos no LES deve-se a aumento da apoptose nas células e remoção incompleta dos debris celulares, expondo vários epítomos até então desconhecidos do sistema imune (MUÑOZ et al., 2010). Diferentes células no LES apresentam aumento na apoptose, especialmente os linfócitos (COURTNEY et al., 1999; WHANG et al., 2005). Maior expressão do sistema Fas/Fas ligante, assim como maior ativação da caspase 3 foram encontrados em linfócitos T de pacientes com LES (XUE et al., 2006). A remoção dos corpos apoptóticos apresenta-se deficiente nos pacientes com LES. Não só os fagócitos desses pacientes apresentam menor capacidade de fagocitose dos corpos apoptóticos, mas também o maior consumo de proteínas do sistema complemento durante a fase aguda da doença contribuem para a menor opsonização dos corpos apoptóticos, e conseqüentemente maior exposição desses antígenos ao sistema imune (MUÑOZ et al., 2010). Persistência dessas células apoptóticas não fagocitadas, logo resulta em necrose secundária das mesmas, formação de ICs e posterior internalização dos mesmos pelas células dendríticas com secreção de grande quantidade de IFN- α (KRUSE et al., 2010).

Figura 2 - Vias imunológicas e loci de susceptibilidade relacionados com a patogênese do LES



Fonte: Deng e Tsao (2010).

Nota: (a) Gatilhos do meio ambiente induzem apoptose celular e liberação de antígenos nucleares para o meio extracelular. Devido a fagocitose defeituosa, ocorre exposição prolongada desses antígenos ao sistema imune. (b) Fragmentos de ácido nucleico endógeno estimulam receptores intracitoplasmático do tipo Toll a produzirem IFN- α . (c) Células dendríticas apresentam antígenos nucleares aos linfócitos T que produzem citocinas. Algumas citocinas agem nos linfócitos B estimulando a produção de autoanticorpos e posterior formação de imunocomplexos.

As células B também exercem papel fundamental na patogênese do LES (GATTO et al., 2013). Além da produção de autoanticorpos, os quais medeiam lesão tecidual, as células B também processam e apresentam antígenos para as células T (RAHMAN; ISENBERG, 2008). Células B autorreativas aparecem precocemente durante sua própria ontogenia em pacientes com LES devido à falha nos mecanismos dos pontos de controle (YURASOV et al., 2005). Sinalização aumentada do receptor de célula B (BCR) ocasionando um estado de hiperatividade da mesma deve-se a uma diminuição intracelular de reguladores negativos da

sinalização do BCR, tais como FcγRIIB e a proteína tirosina quinase Lyn (FLORES-BORJA et al., 2005; JENKS; SANZ, 2009).

As células T apresentam-se hiperresponsivas levando a maior estimulação das células B (CRISPIN et al., 2008; RAHMAN; ISENBERG, 2008). Após estimulação antigênica, ocorre amplificação na transdução do sinal, seja porque no complexo CD3-receptor de célula T a cadeia CD3ζ está substituída pela cadeia FcγR a qual possui maior interação com a quinase Syk (KRISHNAN et al., 2008) ou porque na membrana plasmática dessas células os *lipid rafts* encontram-se agregados (LI et al., 2007). No entanto, a produção da interleucina-2 (IL-2) encontra-se diminuída, o que acarreta redução no número e na função das células T regulatórias (Treg) e supressão na morte celular induzida, sendo assim, ocasionando maior duração dessas células T autorreativas nos pacientes com LES (CRISPIN et al., 2008). Enquanto as células T CD4+ encontram-se aumentadas, as células T CD8+ apresentam deficiência na sua capacidade citotóxica (KAMER et al., 2002).

Além do maior nível sérico do IFN-α e menor concentração da IL-2, anteriormente comentado, outras citocinas apresentam papel fundamental na patogênese do LES. Além de aumentada, a interleucina-17 (IL-17) apresenta correlação com atividade da doença (DOREAU et al., 2009) e linfócitos Th17 foram encontrados em biópsia renal de pacientes com nefrite lúpica (CRISPIN et al., 2008). Além disso, a IL-17 exerce papel importante na proliferação de linfócitos B e secreção de anticorpos (DOREAU et al., 2009). O estimulador de linfócito B (BLys), pertencente a superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), é um fator crucial na proliferação de linfócitos B e produção de imunoglobulinas. Em pacientes com LES, nível elevado de BLys apresentou correlação com anti-dsDNA e maior atividade da doença (CHEEMA et al., 2001). Recentemente, belimumabe (anticorpo monoclonal anti-BLys) foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* para tratamento de LES sem envolvimento renal (GATTO et al., 2013). Outras citocinas, como IL-6, interleucina-10 (IL-10) e TNF apresentaram tanto em humanos como em modelos animais de LES níveis aumentados. Em pacientes com lúpus, essas citocinas apresentaram correlação com atividade da doença (LÓPEZ; GUTIÉRREZ; SUÁREZ, 2010; YAP; LAI, 2013). O papel das principais citocinas no LES será descrito com mais detalhes na seção 1.7.

A diversidade de autoanticorpos presente no LES é ampla, com variação importante na frequência e nos diferentes antígenos celulares, sendo na maioria componentes do núcleo celular (SHERER et al., 2004). Alguns como anti-dsDNA, anti-Sm, FAN e antifosfolípide fazem parte dos critérios de classificação da doença. Os mecanismos pelos quais os autoanticorpos causam dano tecidual são diversos, incluindo lise celular direta, indução de apoptose e formação de ICs, deposição em órgão alvo, ativação do complemento e subsequente inflamação (REKVIK et al., 2012). Alguns autoanticorpos apresentam associação com manifestações clínicas da doença bem definida como anti-dsDNA, anti-nucleossomo e anti-C1q com nefrite lúpica, antifosfolípide com trombose, anti-proteína P ribossomal e anti-NMDAr com lúpus neuropsiquiátrico (GATTO et al., 2013; REKVIK et al., 2012; SHERER et al., 2004).

1.5.4 Fatores genéticos e epigenética

Predisposição genética para o desenvolvimento da doença foi demonstrada através de estudos em famílias, onde foi observado maior frequência de LES em gêmeos monozigóticos quando comparados com gêmeos dizigóticos (24-57% contra 2-5%) e maior risco de desenvolvimento da doença em irmãos de portadores de LES quando comparados com a população em geral (20-29 vezes maior) (ALARCON-SEGOVIA et al., 2005; DEAPEN et al., 1992).

LES é considerado uma doença poligênica, no entanto alguns raros casos monogênicos da doença têm sido descritos devido a mutações altamente penetrantes em genes do sistema complemento C1q, C2, C4 (BOTTO et al., 2009), deficiência completa no FcγRIIIB (FANCIULLI et al., 2007), na enzima DNase tipo III, também conhecida como TREX1 (LEE-KIRSCH et al., 2007) e recentemente, na proteína quinase C δ (BELOT et al., 2013). No entanto, na grande maioria dos casos a susceptibilidade genética para a doença deve-se provavelmente a variações comuns em genes encontrados na população e cada uma contribui para o risco da doença, sendo a combinação entre esses alelos que apresenta efeito aditivo para o desenvolvimento do LES. Essa hipótese é conhecida como “doença comum, variação comum” (BECKER, 2004).

Nos últimos anos, uma combinação de estudos de associação ampla do genoma (GWAS) e genes candidatos em diferentes etnias identificaram mais de 40

genes/loci com associação estatisticamente significativa em pacientes com LES (Quadro 1) (CUI; SHENG; ZHANG, 2013). Esses genes induzem a transcrição de proteínas que participam de vias biológicas importantes como apoptose e remoção de material apoptótico ou ICs, imunidade inata e adaptativa, produção de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (Figura 2). Tanto genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) quanto genes não pertencentes ao MHC têm sido relacionados com susceptibilidade ao LES. Interessante que muitos desses genes compartilham associação com outras doenças autoimunes, implicando vias moleculares semelhantes em várias doenças autoimunes (Quadro 1).

Quadro 1 – Genes, localização cromossômica e vias imunológicas envolvidas na susceptibilidade ao LES e com outras doenças autoimunes

Via imunológica	Cromossomo	Genes	Outras doenças autoimunes
Regulação do HLA	6p21.32-33	<i>HLA-DRB1</i>	DT1, AR, DC, DII
Sinalização de célula T	1p13	<i>PTPN22</i>	DT1, AR, DG, TH, MG, ES, VG, AIJ, AA
	1q25.1	<i>TNFSF4</i>	ES
	2q32.3	<i>STAT4</i>	AR, SS, ES, DII, DT1
	11p13	<i>CD44-PDHX</i>	DT1
Sinalização de célula B	1q25	<i>NCF2</i>	
	1q31-32	<i>IL-10</i>	DII, DT1
	2p22.3	<i>RASGRP3</i>	
	4q24	<i>BANK1</i>	ES, AR
	8p23.1	<i>BLK</i>	ES, AR
	8q12	<i>LYN</i>	
	7p12.2	<i>IKZF1</i>	AR, DII DII
Sinalização do IFN	2q24	<i>IFIH1</i>	
	7q32.1	<i>IRF5</i>	AR, DII, ES
	11p15.5	<i>IRF7</i>	DT1
	16q24.1	<i>IRF8</i>	DII, EM
	11q24.3	<i>ETS1</i>	AR
	13q14.11	<i>ELF1</i>	
	19p13.2	<i>TYK2</i>	EM
	22q11.21	<i>UBE2L3</i>	AR, DII, DC
Sinalização NF-κB	5q33.1	<i>TNIP1</i>	OS
	6q23.3	<i>TNFAIP3</i>	AR, DT1, PS, DC, DII
	12q24.33	<i>SLC15A4</i>	
	16p11.2	<i>PRKCB</i>	
Remoção de imunocomplexos	16p11.2	<i>ITGAM</i>	AR, DT1, ES, DG, DII

Fonte: modificada de Cui, Sheng e Zhang (2013, tradução nossa)

Legenda: DT1: diabetes tipo 1, AR: artrite reumatoide, DC: doença celíaca, DII: doença inflamatória intestinal, DG: doença de Graves, TH: tireoidite de Hashimoto, MG: miastenia gravis, ES: esclerose sistêmica, VG: vitiligo generalizado, AIJ: artrite idiopática juvenil, AA: alopecia areata, SS: síndrome de Sjogren, EM; esclerose múltipla, PS: psoríase.

Os genes do sistema antígeno leucocitário humano (HLA) são os que contribuem com maior risco genético para desenvolvimento de LES em várias populações baseado em estudos de GWAS (CUI; SHENG; ZHANG, 2013). O sistema HLA está dividido em três classes (I, II e III) com importante desequilíbrio de ligação abrangendo a região. As regiões de classe II e III são as que estão mais associadas com susceptibilidade genética ao LES. Na região de classe II, três haplótipos individuais *DRB1*1501 (DR2)-DQB1*0602*, *DRB1*0801(DR8)-DQB1*0402* e *DRB1*0301(DR3)-DQB1*0201* foram associados com risco de LES e especificamente *HLA-DR2 (DRB1*1501)* e *HLA-DR3 (DRB1*0301)* apresentaram

associação mais forte com risco de desenvolvimento de LES (GRAHAM et al., 2002). Recentemente, estudos envolvendo GWAS confirmaram essas associações em populações europeia e asiática (GATEVA et al., 2009; YANG et al., 2010). A região de classe III codifica proteínas do sistema complemento e citocinas. Deficiência completa de C1q, embora rara, é fator de risco para LES. Mais de 90% dos indivíduos com essa deficiência desenvolvem LES (WALPORT; DAVIES; BOTTO, 1998). Mais de 75% dos pacientes com deficiência completa de C4 e aproximadamente 20% com deficiência completa de C2 desenvolvem LES (CONNOLLY; HARNARSON, 2012).

Pacientes portadores de LES apresentam maior expressão de genes que regulam a via do IFN- α . Nesse sentido, o gene do fator regulador do IFN 5 (*IRF5*) é um dos genes fora da região do MHC que está mais associado ao LES nos estudos de GWAS (GATTO et al., 2013). Além do *IRF5*, o *IRF7* também está envolvido na predisposição ao LES (GATTO et al., 2013). Outros genes que fazem parte da via de sinalização do IFN- α e que estão associados ao LES pelos estudos de GWAS são: *IRAK1* (quinase 1 associada ao receptor da IL-1), *TNFAIP3* (TNF proteína induzida 3) e *TNPI1* (proteína 1 que interage com *TNFAIP3*) (CONNOLLY; HARNARSON, 2012).

Envolvido com a sinalização dos linfócitos T e que apresenta associação com LES, encontra-se o gene *PTPN22* (proteína tirosina fosfatase não receptor tipo 22) (CUI; SHENG; ZHANG, 2013). Os genes dos receptores Fc γ , principalmente *FC γ RIIA*, *FC γ RIIB*, *FC γ RIIIA* e *FC γ RIIIB*, também apresentam associação com LES (DENG; TSAO, 2010).

Em estudo inédito que avaliou a relação entre risco genético para LES através de 19 polimorfismos de base única (SNPs), já bem associados com susceptibilidade para a doença, e idade de início do LES, observou-se que LES_i esteve associado com maior número de alelos quando comparado com LES_a, o que pode, do ponto de vista genético, explicar em parte o fenótipo mais grave da doença na faixa etária pediátrica do que nos adultos (WEBB et al., 2011).

Adicionalmente, fatores epigenéticos como metilação de DNA, modificações nas histonas e perfil de microRNAs podem apresentar papel no desenvolvimento do LES. Alguns genes superexpressos no LES devido à hipometilação do DNA já foram descritos, tais como: *CD11a*, *CD70*, *PRF1*, *CD40L*, *IL-4* e *IL-6*. Alguns microRNAs encontram-se suprarregulados no LES, como microRNA21, microRNA148 e

microRNA126, que aumentam a hipometilação do DNA, e o microRNA155 que altera função nas células Treg (GATTO et al., 2013).

1.6 HLA-G

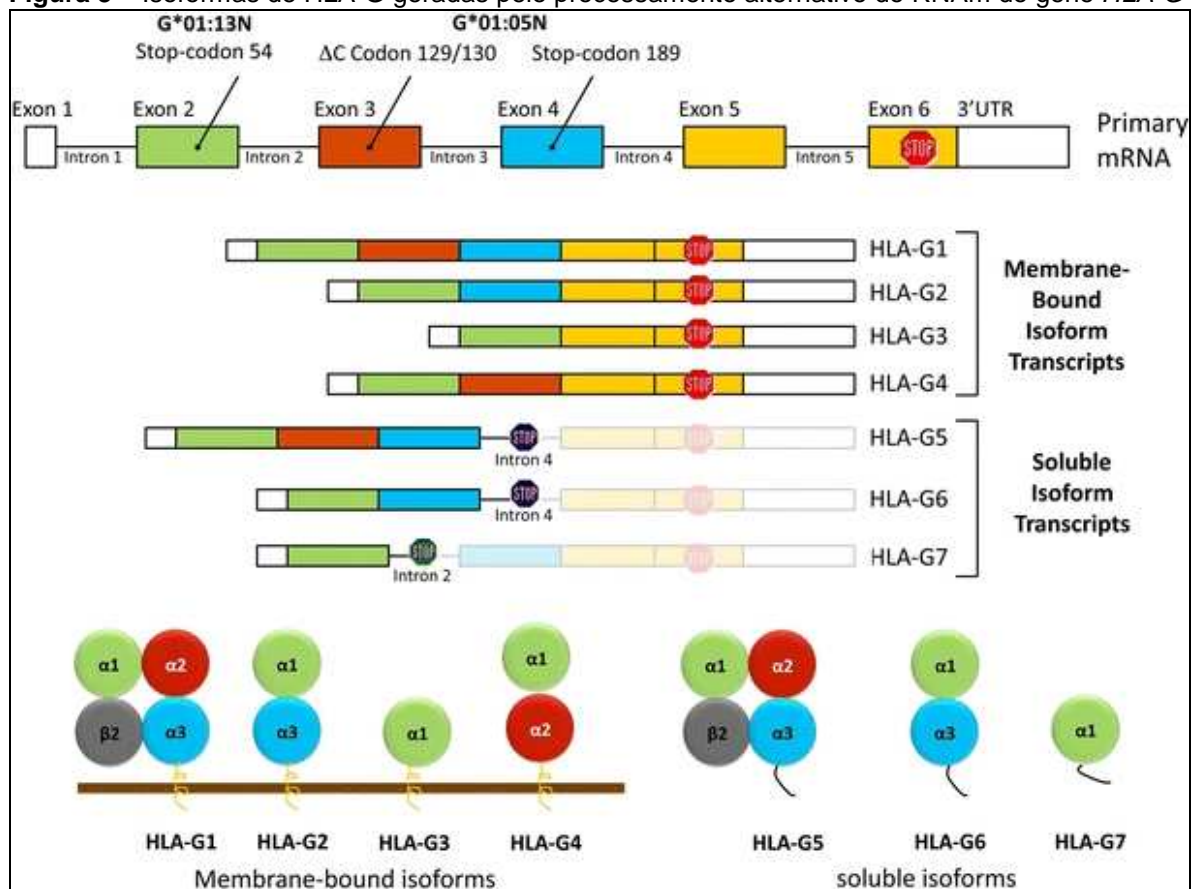
O antígeno leucocitário humano G (HLA-G) pertence ao MHC de classe I e é chamado de MHC não clássico devido: (i) ao seu baixo polimorfismo na região codificante, (ii) padrão de expressão restrito em condições saudáveis e (iii) propriedades biológicas que geram tolerância imunológica (CAROSELLA et al., 2008). Em 1997, foi descrito a primeira função do HLA-G relacionada ao sistema imune (CAROSELLA, 2011). Foi demonstrado que a expressão do HLA-G nas células do citotrofoblasto fetal inibe a citólise pelas células *natural killer* (NK) maternas contribuindo para tolerância materno-fetal e assim permitindo a manutenção da gestação (ROUAS-FREISS et al., 1997). Esse resultado mostrou que a expressão do HLA-G por determinada célula tem ação protetora contra o sistema imune, demonstrando que o HLA-G possui propriedades tolerogênicas (CAROSELLA, 2011).

Além de ser expresso em tecidos fetais, o HLA-G é constitutivamente expresso no timo, córnea, pâncreas e precursores de células endoteliais e eritroides. No entanto, a expressão do HLA-G pode ser induzida em situações como transplantes, doenças inflamatórias, doenças autoimunes, câncer e nas infecções virais (MENIER et al., 2010). O HLA-G exerce ação inibitória nas células NK, linfócitos T CD8+, linfócitos T CD4+ e células apresentadoras de antígenos (APCs) como monócitos, macrófagos e células dendríticas, através de ligação direta com receptores inibitórios ILT2 (do inglês *immunoglobulin like transcript*), ILT4 e KIR2DL4 (do inglês *killer cell immunoglobulin like receptor*), os quais aumentam a sua expressão após ligação com HLA-G. Nas células NK, o HLA-G inibe a função citotóxica, proliferação celular, migração transendotelial, além de induzir apoptose e células NK supressoras. Nos linfócitos T CD8+, inibe também a função citotóxica e proliferação celular, além de induzir apoptose e geração de linfócitos T reg CD8+. Nos linfócitos T CD4+, inibe a proliferação celular e induz também a formação de linfócitos T reg CD4+. Finalmente nas APCs, o HLA-G inibe maturação e tráfico das células dendríticas, apresentação de antígeno e induz APC tolerogênica (CAROSELLA et al., 2008). Sendo assim, esses efeitos são benéficos na gravidez,

transplante e em doenças autoimunes e inflamatórias uma vez que inibem a ação do sistema imune, e são prejudiciais no câncer e em infecções virais, pois permite o escape dessas células patológicas do sistema imune o que favorece o desenvolvimento do tumor e persistência da infecção viral (CAROSELLA et al., 2008).

O gene *HLA-G* está localizado no braço curto do cromossomo 6, apresenta 8 éxons e 7 íntrons que codificam a cadeia pesada da molécula e preserva similaridade com os outros genes do sistema HLA (-A, -B e -C). O éxon 1 codifica o peptídeo sinal; os éxons 2, 3 e 4 o domínio extracelular α_1 , α_2 e α_3 respectivamente; e os éxons 5 e 6 codificam o domínio transmembrana e citoplasmático da cadeia pesada. O éxon 7 é sempre excluído do RNA mensageiro (RNAm) maduro pelo processamento alternativo e devido a presença de códon de parada prematuro no éxon 6, o éxon 8 não é traduzido, sendo considerado a região reguladora 3' não traduzida (3'UTR) do gene *HLA-G* (Figura 3) (DONADI et al., 2011).

Figura 3 – Isoformas de HLA-G geradas pelo processamento alternativo do RNAm do gene *HLA-G*

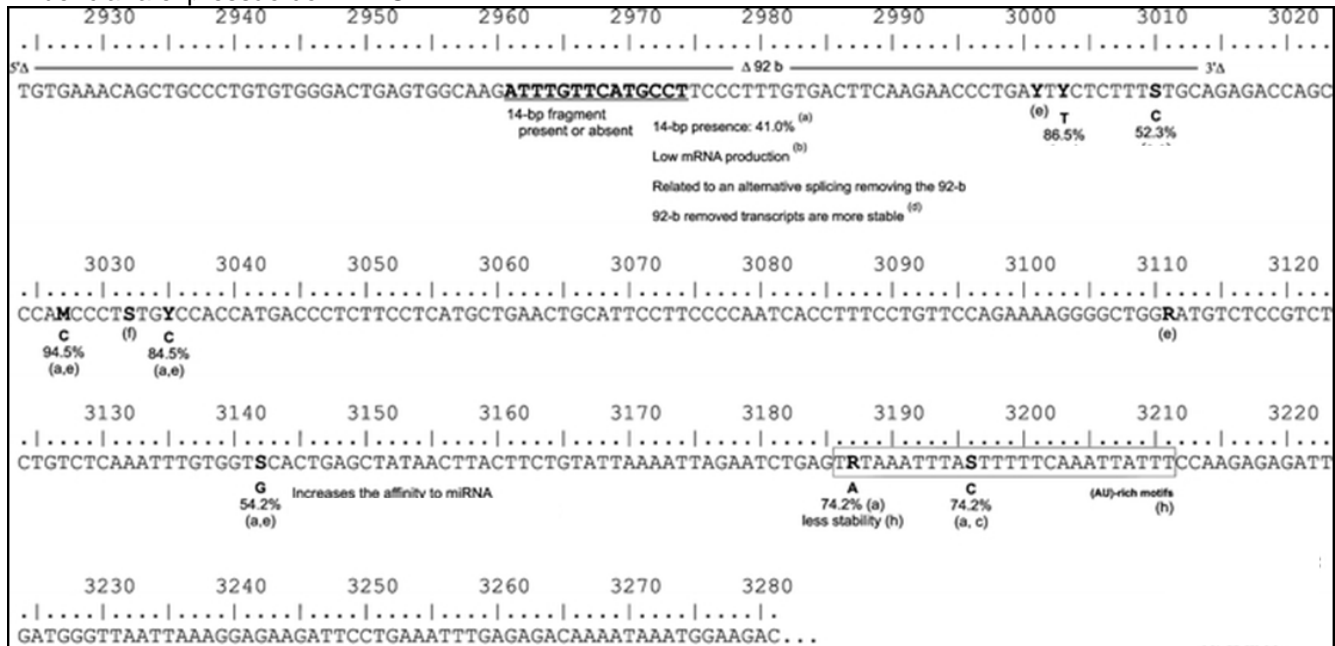


Fonte: Donadi et al. (2011).

Semelhante as moléculas do sistema HLA de classe I, HLA-G apresenta cadeia pesada não covalentemente associada a uma cadeia de $\beta 2$ microglobulina. Na molécula HLA-G, o peptídeo situa-se mais profundamente na fenda em comparação com as outras moléculas do HLA clássico. Essa característica torna improvável que a molécula HLA-G desempenhe papel importante na apresentação de antígeno. Devido ao processamento alternativo no transcrito primário, as proteínas do HLA-G podem ocorrer em 7 diferentes isoformas, sendo 4 ligadas à membrana (HLA-G1, G2, G3 e G4) e 3 solúveis (HLA-G5, G6 e G7). HLA-G1 é a forma completa associada com $\beta 2$ microglobulina. Adicionalmente, uma forma solúvel da isoforma HLA-G1 pode ser gerada pela clivagem proteolítica da molécula ligada à membrana. HLA-G2 não possui o domínio $\alpha 2$ codificado pelo éxon 3. HLA-G3 não possui domínios $\alpha 2$ e $\alpha 3$ codificado pelos éxons 3 e 4. HLA-G4 não possui domínio $\alpha 3$ codificado pelo éxon 4. Nas isoformas G5-G7, os domínios transmembrana e citoplasmático não são traduzidos, resultando em formas solúveis. HLA-G5 e HLA-G6 apresentam o mesmo domínio extracelular de HLA-G1 e HLA-G2, respectivamente. HLA-G7 apresenta apenas o domínio $\alpha 1$ (DONADI et al., 2011). A Figura 3 ilustra as diferentes isoformas produzidas pelo processamento alternativo do RNAm do HLA-G.

O gene *HLA-G* apresenta polimorfismos na região promotora e 3'UTR que desempenham papel na regulação da expressão da molécula HLA-G. Na região 3'UTR, 8 polimorfismos estão bem definidos: inserção>deleção de 14 pares de base (Del>Ins 14 pb) (rs 371194629) e sete SNPs: +3003 T>C (rs 1707), +3010 C>G (rs 1710), +3027 C>A (rs 17179101), +3035 C>T (rs 17179108), +3142 G>C (rs 1063320), +3187 A>G (rs 9380142) e +3196 C>G (rs 1610696). Alelos relativos ao sítio polimórfico Del>Ins 14 pb estão associados com estabilidade do RNAm. Alelo Ins 14 pb induz processamento na região 3'UTR do RNAm que ocasiona deleção de 92 bases tornando RNAm menos propenso à degradação, exibindo maior estabilidade da molécula. Em relação ao SNP +3142, a presença de guanina aumenta a afinidade dessa região para microRNAs (148a, 148b e 152) e conseqüentemente maior degradação do RNAm e menor expressão de HLA-G. Já a presença de adenina na posição +3187 está associada à diminuição da estabilidade do RNAm (DONADI et al., 2011; LARSEN; HVIID, 2009). A Figura 4 ilustra os sítios polimórficos (descritos acima) observados na 3'UTR do *HLA-G* que podem influenciar a expressão do HLA-G.

Figura 4 – Sítios polimórficos observados na região 3' não traduzida do gene *HLA-G* que podem influenciar a expressão do HLA-G



Fonte: Modificado de Donadi et al. (2011).

1.6.1 HLA-G no LES

São poucos e com resultados conflitantes os estudos de expressão e polimorfismos na região 3'UTR do *HLA-G* em pacientes com LESa. Para o nosso conhecimento não existem estudos com LESi. Rosado et al. (2008) numa população europeia e Wu et al. (2009) numa população chinesa, encontraram uma maior expressão do HLA-G solúvel (sHLA-G) em pacientes com LESa quando comparado com grupo controle saudável. No entanto, Rizzo et al. (2008) também numa população europeia, encontrou um menor nível sérico do sHLA-G diferentemente dos estudos anteriores.

Em relação aos estudos de polimorfismos da região 3'UTR, os resultados também são divergentes. No mesmo estudo conduzido por Rizzo et al. (2008), foi encontrado uma maior frequência do alelo Ins 14 pb e do genótipo Ins/Ins 14 pb e uma menor frequência do genótipo Del/Del 14 pb em pacientes com LESa. Já no estudo conduzido por Wu et al. (2009) foi encontrado ausência de associação entre o polimorfismo de 14 pb e LESa.

No Brasil, Consiglio et al. (2011) encontrou uma maior frequência do alelo +3142 G e do genótipo +3142 G/G no grupo de pacientes. Recentemente, estudo conduzido pelo nosso grupo avaliou pela primeira vez os 8 polimorfismos da região

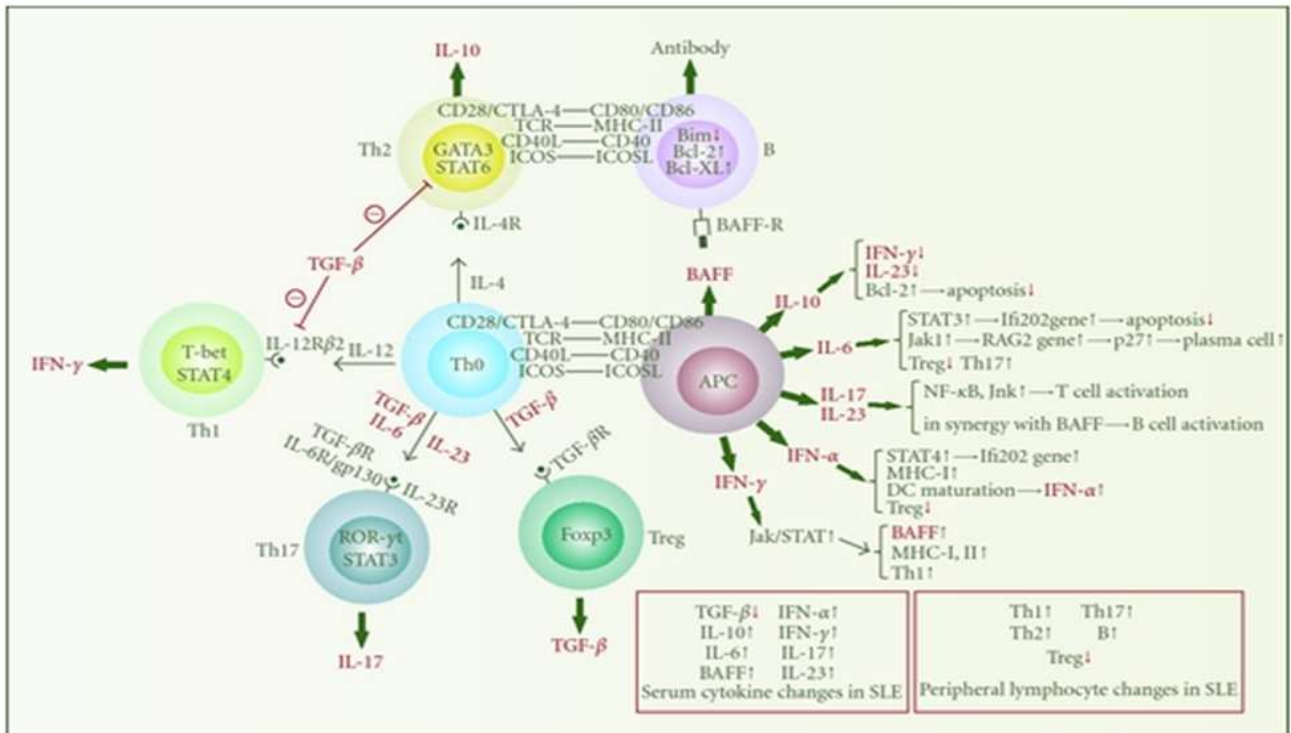
3'UTR do *HLA-G*. Foi encontrado maior frequência dos alelos Ins 14 pb, +3010 C, +3142 G e +3187 A. Os genótipos Ins/Ins 14 pb, +3010 C/C, +3142 G/G e +3187 A/A foram os que apresentaram maior frequência (LUCENA-SILVA et al., 2013). Ambos os estudos acima foram conduzidos em LESa.

1.7 Perfil de citocinas no LES

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular que apresentam papel essencial no controle da diferenciação, maturação e ativação dos vários tipos de células do sistema imune. Anormalidades na liberação de citocinas tem sido identificadas tanto em pacientes quanto em modelos animais de LES, ambos *in vitro* e *in vivo*. Essas citocinas podem exercer funções pró-inflamatórias e anti-inflamatórias ou ambas, dependendo de fatores específicos no microambiente local (SU et al., 2011). Além disso, citocinas são possíveis candidatos para alvos terapêuticos e biomarcadores, uma vez que encontram-se alterados de acordo com atividade da doença (YAP; LAI, 2013).

As células T *helper* (Th) são caracterizadas pelos diferentes perfis de citocinas produzidos. O perfil Th1 produz principalmente IL-2, IFN- γ e TNF. Já as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 fazem parte do perfil Th2. O perfil Th17 é caracterizado principalmente pela IL-17 e IL-6, enquanto as células Treg produzem as citocinas anti-inflamatórias IL-10 e fator de crescimento transformador (TGF)- β . Diante dos resultados dos estudos em LES em humanos e modelos animais, acredita-se que no LES haja aumento periférico dos linfócitos Th1, Th2, Th17 e linfócitos B e redução dos linfócitos Treg, como ilustrado na Figura 5 (SU et al., 2011). A seguir, descreveremos sucintamente o papel de cada citocina no LES, e abordaremos os polimorfismos dos genes da IL-10 e TNF.

Figura 5 – Rede de citocinas presente no LES



Fonte: Modificada de Su et al. (2011)

Nota: Esta figura ilustra as principais citocinas e perfis celulares dos linfócitos relacionados com a patogênese do LES. Maiores detalhes no texto.

1.7.1 TGF-β

Fator de crescimento transformador (TGF)-β e IL-10 são as principais citocinas anti-inflamatórias encontradas no LES. O TGF-β é produzido por várias células do sistema imune, no entanto o linfócito Treg é a sua principal fonte. Recente estudo em LESa demonstrou baixa concentração sérica do TGF-β em paralelo com redução dos linfócitos Treg na periferia (XING et al., 2012). Os linfócitos Treg possuem papel essencial na supressão de linfócitos T autorreativos. Depleção dos linfócitos Treg leva indução de várias doenças autoimunes em modelos animais (SU et al., 2011).

1.7.2 IL-10

A IL-10 é a principal citocina anti-inflamatória, sendo assim apresenta efeito em várias células do sistema imune incluindo linfócitos Th1 e Th2, linfócitos B, células NK, monócitos, macrófagos, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos

(KARIMABAD et al., 2013). A IL-10 exerce suas ações através de ligação direta com seu receptor de superfície IL-10R e a transdução do sinal ocorre através do sistema Jak/stat (MOORE et al., 2001). A IL-10 é produzida por várias células do sistema imune, incluindo macrófagos, células dendríticas, células Treg e células Th1 e Th2 (MOORE et al., 2001; SABAT et al., 2010).

Os monócitos e macrófagos são as principais células alvo da IL-10, a qual inibe a produção das principais citocinas pró-inflamatórias, entre elas TNF, IL-1, IL-6, IL-18 e IL-12. Além disso, a IL-10 aumenta a secreção de mediadores anti-inflamatórios como o antagonista do receptor da IL-1 e receptores solúveis do TNF. A IL-10 também inibe a apresentação de antígenos, pois reduz a expressão de moléculas do MHC classe II e moléculas coestimulatórias em monócitos, macrófagos e células dendríticas (MOORE et al., 2001; SABAT et al., 2010).

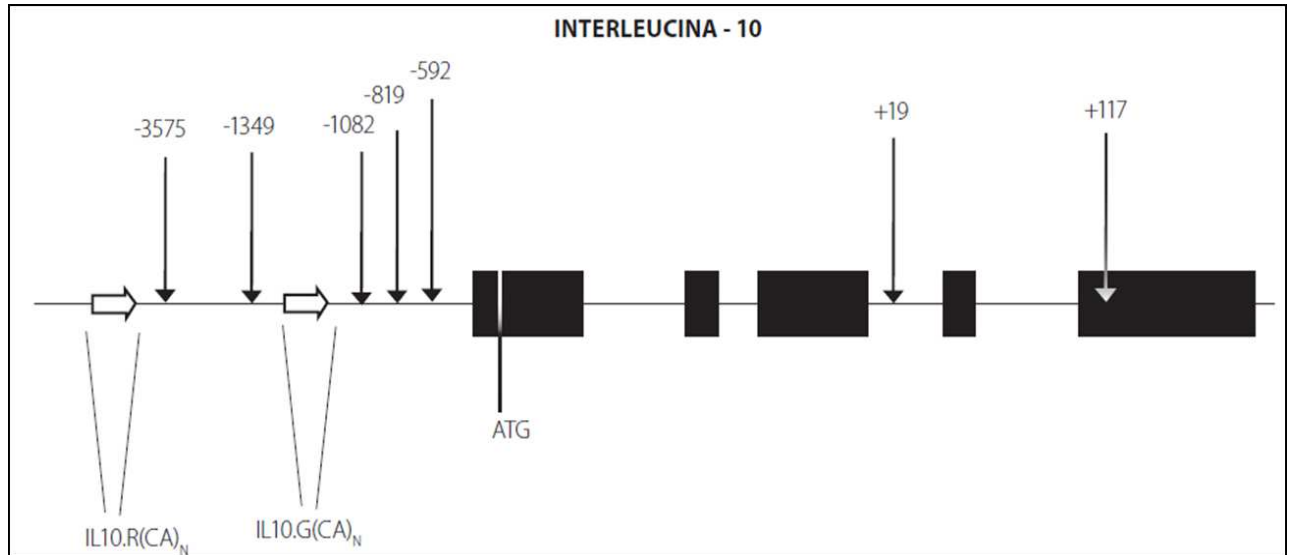
A IL-10 também inibe a proliferação dos linfócitos T CD4+ e produção de IL-2 e IFN- γ pelas células Th1, e IL-4 e IL-5 pelas células Th2. No entanto, a IL-10 não é capaz de suprimir a produção de IL-17 pelas células Th17 e não possui ação inibitória nos linfócitos T CD8+. De maneira similar que atua nos monócitos e macrófagos, a IL-10 também impede a secreção dos mediadores dos neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (MOORE et al., 2001; SABAT et al., 2010).

Particularmente, a IL-10 apresenta importante função estimulatória nos linfócitos B. Sendo assim, ela previne apoptose das células B e aumenta proliferação, diferenciação e produção de anticorpos (MOORE et al., 2001; SABAT et al., 2010).

O gene *IL-10* está localizado no braço longo do cromossomo 1 e possui 5 éxons e 4 íntrons. A região promotora é altamente polimórfica envolvendo duas repetições dinucleotídicas de citosina e adenina e três SNPs localizados nas posições -1082 G>A (rs 1800896), -819 C>T (rs 1800871) e -592 C>A (rs 1800872) a partir do sítio de início da transcrição. Esses polimorfismos estão ilustrados na Figura 6. Ocorre desequilíbrio de ligação completo entre os alelos presentes nas posições -819 e -592 e somente três haplótipos foram encontrados em populações caucasianas (GCC, ACC e ATA) (LÓPEZ; GUTIÉRREZ; SUÁREZ, 2010). Atualmente tem sido difícil relacionar a exata associação entre genótipo e correspondente produção de citocina. Turner et al. (1997) encontrou que o alelo -1082 G estava associado com maior produção de IL-10 após estimulação de linfócitos com concavalina A *in vitro*. No entanto, outros autores realizando

experimento similar encontraram resultados contraditórios entre produção de IL-10 e genótipo (REES et al., 2002). Sendo assim, estudos funcionais não suportam a hipótese que o polimorfismo -1082 G>A apresenta efeito na produção da IL-10.

Figura 6 – Gene da IL-10 com visualização dos polimorfismos na região promotora



Fonte: Casas (2008).

Além de ter o seu gene localizado num importante lócus de susceptibilidade para LES no cromossomo 1 (JOHANNESON et al., 2002), a IL-10 aumenta a proliferação, diferenciação e produção de anticorpos pelos linfócitos B. Sendo assim, produção aumentada de IL-10 pode explicar a hiperatividade dos linfócitos B e maior produção de autoanticorpos no LES. De fato, vários estudos encontraram níveis elevados dessa citocina em pacientes com LES e correlação com atividade da doença (HAGIWARA et al., 1996; HOUSSIAU et al., 1995; PARK et al., 1998). Essas evidências sugerem que o *IL-10* é um gene candidato de susceptibilidade para LES.

Alguns estudos apresentaram resultados conflitantes entre associação dos SNPs nas posições -1082, -819 e -592 e susceptibilidade para LES (LÓPEZ; GUTIÉRREZ; SUÁREZ, 2010). No entanto, estudos de meta-análise tentam superar as limitações dos estudos individuais. Liu et al. (2013) encontrou que o alelo G do polimorfismo -1082 G>A e o haplótipo GCC apresentaram forte associação com susceptibilidade para LES. Esse mesmo resultado também foi encontrado pela meta-análise de Song et al. (2013). Numa meta-análise apenas com o polimorfismo -1082 G>A em pacientes com LES, também foi encontrada associação com o alelo G e o genótipo GG para desenvolvimento da doença (ZHOU et al., 2013).

Todos os estudos descritos acima envolveram apenas LESa. Recentemente foi publicado um único estudo entre polimorfismo do gene *IL-10* e LESi numa população asiática. Além de maior nível sérico da IL-10, também foi encontrada associação com os genótipos -819 C/C e -592 C/C para susceptibilidade ao LESi. O haplótipo GCC apresentou associação com nefrite lúpica e não foi encontrada associação com o genótipo -1082 G/G (RIANTHAVORN et al., 2013). Até o presente momento, não existem estudos brasileiros entre polimorfismos da região promotora do *IL-10* em pacientes com LESi.

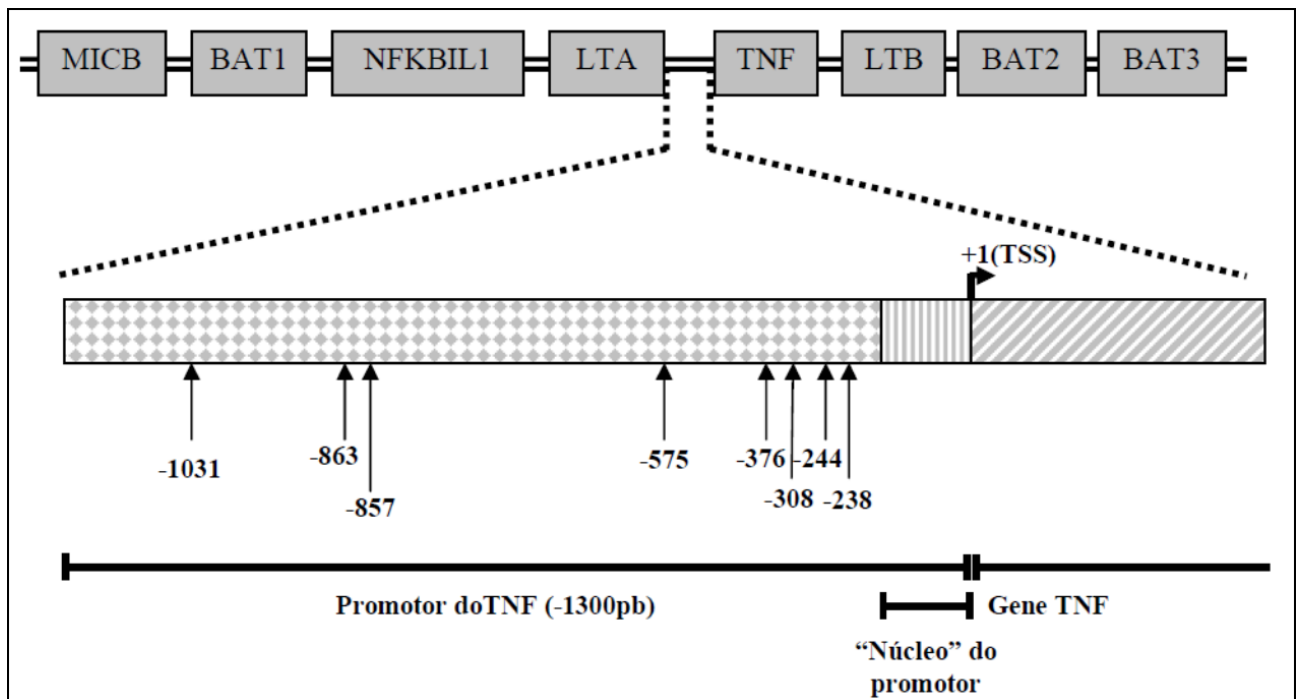
1.7.3 TNF

O TNF é uma importante citocina pró-inflamatória e imunoregulatória com efeito em várias células tanto da imunidade inata quanto adaptativa e está diretamente envolvida com apoptose. As principais fontes dessa citocina são os macrófagos e linfócitos ativados. O TNF liga-se a dois receptores de superfície celular o TNFR1 e TNFR2 (POSTAL; APPENZELLER, 2011).

O TNF estimula a produção de citocinas inflamatórias, entre elas IL-1 e IL-6, aumenta a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular e também ativação dos neutrófilos. Além disso, nos linfócitos B o TNF age como um fator de crescimento estimulando a produção de autoanticorpos, e nos linfócitos T além de estimular a proliferação dessas células, aumenta a expressão de moléculas do MHC e a produção do IFN- γ . Devido a sua potente ação pró-inflamatória, quanto maior a expressão tecidual do TNF maior atividade inflamatória no local (ARINGER; SMOLEN, 2003).

O gene *TNF* está localizado no cromossomo 6p21, na região do MHC de classe III e possui quatro éxons. A diversidade genética na região do promotor, incluindo seis microssatélites e vários SNPs, tem sido associada com diversas doenças autoimunes (BAYLEY; OTTENHOFF; VERWEIJ, 2004). Os polimorfismos da região promotora do gene TNF estão ilustrados na Figura 7. Entre esses polimorfismos, o -308 G>A (rs 1800629) é o mais estudado (GENOV; SOLÉ, 2007; LÓPEZ; GUTIÉRREZ; SUÁREZ, 2010). Recentemente, estudo funcional e meta-análise entre polimorfismo -308 G>A e produção do TNF não encontrou nenhuma associação entre determinado genótipo e produção do TNF (MEKINIAN et al., 2011).

Figura 7 - Gene do TNF com visualização dos polimorfismos na região promotora



Fonte: Genov e Solé (2007)

Devido a sua ação regulatória na inflamação e participação direta na apoptose, dois processos envolvidos na patogênese do LES, e principalmente após vários estudos demonstrarem maior nível sérico de TNF em pacientes com LES comparado com grupo controle saudável e alguns desses estudos associação do TNF com atividade da doença, esses dados sugerem um papel importante do TNF na patogênese da doença (LÓPEZ; GUTIÉRREZ; SUÁREZ, 2010; POSTAL; APPENZELLER, 2011).

Até o presente momento, quatro meta-análises foram conduzidas entre polimorfismos da região promotora do gene *TNF* e susceptibilidade ao LES. Dessas quatro, três foram com o polimorfismo na posição -308 e uma na posição -238. Lee, Harley e Nath (2006) encontraram associação entre o alelo A e o genótipo A/A na posição -308 com susceptibilidade ao LES, principalmente em europeus. Zou et al. (2011) analisando o polimorfismo -308 G>A, utilizando apenas estudos com populações de origem asiática, também encontraram associação entre o alelo A e susceptibilidade ao LES, principalmente em chineses. Pan et al. (2012) encontraram resultado semelhante aos dos dois estudos anteriores, o que corrobora associação entre o alelo A e o genótipo A/A com susceptibilidade ao LES. A única meta-análise

realizada com o polimorfismo -238 G>A, encontrou associação com o genótipo A/A e susceptibilidade ao LES, principalmente em caucasianos (ZOU et al., 2010).

O único estudo realizado em uma população brasileira de LESa, também encontrou associação entre o alelo A e genótipo A/A com susceptibilidade ao LES (ANGELO et al., 2012). Não existem estudos brasileiros entre polimorfismos da região promotora do *TNF* e LESi. Único estudo realizado em crianças foi numa população egípcia com LESi e foram avaliados os polimorfismos -863C>A e -1031T>C. Nesse estudo foi encontrada associação entre o genótipo -863A/A e predisposição para LESi (FARID et al., 2011). Sendo assim, não existem estudos de nenhuma etnia avaliando os polimorfismos -308G>A e -238G>A do gene do *TNF* em LESi.

1.7.4 IL-6

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica com várias funções biológicas. É produzida principalmente por monócitos e células endoteliais e em menor quantidade por outros tipos celulares como linfócitos T e B, queratinócitos e células mesangiais. Possui diversas ações biológicas, no entanto de grande importância para o LES está a maturação dos linfócitos B no seu estágio final os quais se diferenciam em plasmócitos e conseqüentemente aumenta a produção de imunoglobulinas. Além disso, IL-6 na presença do TGF- β induz linfócitos T CD4+ virgem a se diferenciarem para linfócitos Th17 (RAPHAEL et al., 2015).

Estudos em adultos com LES já demonstraram aumento da IL-6 e associação com atividade da doença e anti-dsDNA. Além do efeito sistêmico, a IL-6 também apresenta ação local com associação com algumas manifestações clínicas da doença como nefrite, artrite e envolvimento neuropsiquiátrico (TACKEY; LIPSKY; ILLEI, 2004).

1.7.5 IL-17

IL-17, também conhecida como IL-17A, é a principal citocina produzida pelos linfócitos Th17. É potente citocina pró-inflamatória com múltiplas funções na regulação da inflamação tecidual. Até então, seis diferentes tipos de IL-17, a saber IL-17A a IL-17F, foram descritos e apresentam similaridades estruturais. Os

membros mais conhecidos são a IL-17A e IL-17F (RAPHAEL et al., 2015). IL-17 exerce papel importante em várias doenças autoimunes e na resposta imune contra bactérias e fungos (KORN et al., 2009). No LES a IL-17 promove inflamação atuando tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Acarreta dano tecidual através do recrutamento de neutrófilos e macrófagos e facilita a infiltração de células T. Além disso, estimula a proliferação de linfócitos B, produção de autoanticorpos e principalmente inibe a diferenciação das células Treg (LI et al., 2015).

Vários estudos descreveram concentrações elevadas de IL-17A em pacientes com LESa quando comparado com grupo controle saudável. Alguns estudos também registraram associação desta citocina com atividade da doença e associação com nefrite lúpica e lesões cutâneas da doença (KONYA et al., 2015).

2 JUSTIFICATIVA

O LESi, assim como o LESa, apresenta importante componente imunológico na patogênese da doença, embora menos explorado do que LESa. A maioria dos estudos de perfil de citocinas e de associação genética foram realizados em adultos, sendo poucos os estudos conduzidos em crianças e adolescentes gerando escassez de dados nesta faixa etária específica.

Diante das considerações descritas sobre as diversas ações imunomodulatórias da molécula HLA-G no sistema imune e o papel dos polimorfismos da região 3'UTR na expressão do HLA-G; das ações da IL-10 e do TNF na patogênese do LES e o papel dos polimorfismos da região promotora dos respectivos genes com susceptibilidade no desenvolvimento do LES, o presente estudo propõe caracterizar: (i) perfil de citocinas Th1, Th2, Th17 e Treg, (ii) expressão da molécula HLA-G e (iii) polimorfismos nos genes *HLA-G*, *IL-10* e *TNF* numa amostra da população brasileira com LESi. No Brasil, ainda não foram realizados estudos de associação genética do LESi com polimorfismos nos genes acima descritos, sendo interessante determinar essa associação e comparar com dados de outras etnias para melhor caracterização imunogenética das crianças e adolescentes brasileiros portadores de LES.

3 OBJETIVOS

- a) Avaliar oito polimorfismos da 3'UTR do gene *HLA-G* e determinar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos sítios polimórficos 14 pb Del>Ins (rs371194629), +3003 T>C (rs1707), +3010 C>G (rs1710), +3027 C>A (rs17179101), +3035 C>T (rs17179108), +3142 G>C (rs1063320), +3187 A>G (rs9380142) e +3196 C>G (rs1610696) em pacientes com LESi e comparar com grupo controle saudável. Investigar associação com a doença e variáveis clínicas e laboratoriais;
- b) Avaliar cinco polimorfismos da região promotora do gene *TNF* e determinar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos sítios polimórficos -1031 T>C (rs1799964), -863 C>A (rs1800630), -857 C>T (rs1799724), -308 G>A (rs1800629) e -238 G>A (rs361525) em pacientes com LESi e comparar com grupo controle saudável. Investigar associação com a doença e variáveis clínicas e laboratoriais;
- c) Avaliar dois polimorfismos da região promotora do gene *IL-10* e determinar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos sítios polimórficos -1082 G>A (rs1800896) e -819 C>T (rs1800871) em pacientes com LESi e comparar com grupo controle saudável. Investigar associação com a doença e variáveis clínicas e laboratoriais;
- d) Avaliar a produção da proteína sHLA-G no sangue periférico de pacientes com LESi e comparar com grupo controle saudável. Investigar associação com a doença e variáveis clínicas e laboratoriais. Avaliar a associação dos polimorfismos genéticos do *HLA-G* com a expressão da proteína sHLA-G;
- e) Avaliar o perfil de citocinas Th1, Th2, Th17 e Treg no sangue periférico de pacientes com LESi e comparar com grupo controle saudável. Investigar associação com a doença e variáveis clínicas e laboratoriais. Avaliar a associação dos polimorfismos genéticos dos genes *IL-10* e *TNF* com a expressão das respectivas citocinas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho e população do estudo

Para o estudo dos polimorfismos da região 3'UTR do gene *HLA-G* e regiões promotoras do gene *TNF* e *IL-10*, o desenho foi do tipo caso-controle. Pacientes portadores de LESi, idade menor que 18 anos ao início da doença (SILVA; AVCIN; BRUNNER, 2012), provenientes dos ambulatórios de reumatologia pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) foram convidados para participarem do estudo. Os pacientes foram incluídos no estudo se: (i) preencherem pelo menos quatro critérios de classificação para LES do ACR (HOCHBERG, 1997), (ii) serem menores de 18 anos de idade ao início da doença e (iii) apresentarem um acompanhamento mínimo de 6 meses nos respectivos ambulatórios. No total foram incluídos 51 pacientes, sendo 32 pacientes do HC-UFPE e 19 do IMIP. Obtivemos como resultado do cálculo do tamanho amostral um total de 57 casos, número próximo ao que foi recrutado para este estudo.

Desses 51 pacientes, 10 participaram de um estudo de seguimento longitudinal para avaliação do perfil de citocinas em dois momentos distintos: um com doença ativa e o outro com doença inativa ou vice-versa; de acordo com escore de atividade da doença *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000* (SLEDAI-2K).

O grupo controle foi composto por crianças e adolescentes saudáveis provenientes de escolas da rede municipal da cidade de Recife. Eles preencheram questionário em conjunto com seus pais onde foram perguntados sobre antecedente familiar de câncer e outras doenças autoimunes (APÊNDICE A). Apenas aqueles sem história familiar dessas doenças participaram do estudo. No momento da coleta de sangue, todo o grupo controle passou por avaliação médica a fim de descartar qualquer possibilidade de infecção.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-UFPE, do CPqAM e do IMIP (CAAE: 02400512.2.0000.5208) (ANEXO A, B e C). Todos os sujeitos que participaram da pesquisa assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE B e C). Para os menores de idade, um dos pais ou responsável legal assinou o TCLE. Após assinatura do mesmo, uma amostra de

sangue periférico foi coletada e encaminhada para o laboratório de Imunogenética do CPqAM, local onde foram realizados a maior parte dos experimentos.

4.2 Manifestações clínicas e laboratoriais

Todos os pacientes foram submetidos à avaliação clínica e laboratorial padronizada. Na data da coleta de sangue, os prontuários médicos dos pacientes foram avaliados para registro de dados demográficos (idade de início dos sintomas de LESi, idade ao diagnóstico da doença e gênero) e história familiar de doença autoimune. Foram registradas as seguintes manifestações clínicas específicas do LESi: envolvimento cutâneo, mucoso, renal, neuropsiquiátrico, cardiovascular, pulmonar, hematológico (anemia hemolítica, leucopenia < 3.000 leucócitos/mm³ e plaquetopenia < 150.000 plaquetas/mm³) e articular, bem como a presença de síndrome do anticorpo antifosfolípide. Amostras de sangue e urina dos pacientes foram coletadas para dosagens de FAN por imunofluorescência indireta utilizando células de epitélio humano (HEp-2) como substrato, anti-dsDNA também por imunofluorescência indireta utilizando *Crithidia* como substrato, níveis séricos de C3 e C4 por nefelometria, hemograma, sumário de urina e proteinúria de 24 horas.

Na ocasião, a maioria dos pacientes fazia uso regular de tratamento imunossupressor para controle da doença (glicocorticoides e antimaláricos, em associação com azatioprina, metotrexato, ciclofosfamida endovenosa ou micofenolato de mofetila).

4.3 Atividade da doença

A avaliação da atividade da doença foi medida utilizando o *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000* (SLEDAI-2K) (GLADMAN; IBANEZ; UROWITZ, 2002). SLEDAI-2K apresenta pontuação que varia entre 0 e 105. Pontuação ≥ 4 foi considerada como doença ativa (YEE et al; 2011). O SLEDAI-2K foi determinado em cada paciente no momento da coleta de sangue referente aos últimos dez dias (ANEXO D).

4.4 Separação de células periféricas mononucleares

Após coleta de sangue periférico em tubo contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), as células mononucleares foram separadas por centrifugação em gradiente de densidade utilizando o reagente Ficoll-Paque® (GE Healthcare, USA) conforme recomendações do fabricante. Após serem lavadas com tampão fosfato salino (PBS) pH 7.2, centrifugadas a 12.000 x *g* e armazenadas em precipitado a uma temperatura de -80°C até o seu uso. Neste mesmo processo, o plasma foi obtido e armazenado a -80°C para dosagem das citocinas.

4.5 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído das células mononucleares utilizando o reagente DNAzol (Invitrogen, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Após homogeneização da amostra com DNAzol, o DNA foi precipitado com etanol a 100%. Em seguida, foi centrifugado a 12.000 x *g*, o precipitado de DNA lavado com etanol a 75% por duas vezes, colocado para secar e eluído em NaOH 8 mM. Esse DNA foi utilizado nos estudos de variabilidade genética.

4.6 Genotipagem da 3'UTR do gene *HLA-G*

A amplificação da 3'UTR do gene *HLA-G* foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os iniciadores específicos *HLA8F* 5'-TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT-3'; *HLA8R* 5'-GTCTTCCATTTATTTGTCTCT-3', previamente descritos na literatura (CASTELLI et al., 2010). A reação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, USA) em um volume final de 20 µL contendo tampão de PCR 1X; 1,5 mM de MgCl₂; 200 µM de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP); 0,5 pmol de cada iniciador, 1 U de *Taq* DNA polimerase (BioTools, Madrid, Spain) e aproximadamente 100 ng de DNA de cada sujeito. As condições da reação foram: 1) desnaturação inicial: 94°C durante 3 minutos; 2) 5 ciclos: 94°C por 1 minuto; 63°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto; 3) 35 ciclos: 94°C por 1 minuto; 60°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto; 4) extensão final: 72°C por 7 minutos. O produto de amplificação foi visualizado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio 0,1 µg/mL e fotodocumentado em transiluminador de luz ultravioleta (UV).

Aqueles que apresentaram fragmento de aproximadamente 350 pb foram enviados para o Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM para serem sequenciados, sendo utilizado o iniciador reverso da PCR e o BigDye Terminator Kit em sequenciador ABI3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

4.7 Genotipagem da região promotora do gene *TNF*

A amplificação da região promotora do gene *TNF* foi realizada por PCR utilizando os iniciadores específicos *forward* 5'-CTCAGAGAGCTTCAGGGATAT-3' e reverso 5'-TGGAGAAGAAACCGAGACAGA-3', que foram desenhados pelo nosso grupo (GOMES, 2014). A reação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, USA) em um volume final de 20 µL contendo tampão de PCR 1X; 1,5 mM de MgCl₂; 300 µM de dNTP; 0,5 pmol de cada iniciador; 1 U de *Taq* DNA polimerase (BioTools) e aproximadamente 100 ng de DNA de cada sujeito. As condições da amplificação foram: 1) desnaturação inicial: 94°C durante 3 minutos; 2) 30 ciclos: 94°C por 45 segundos; 60°C por 30 segundos; 72°C por 45 segundos; 3) extensão final: 72°C por 7 minutos. O produto de amplificação foi visualizado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio 0,1 µg/mL e fotodocumentado em transiluminador de luz UV. Aqueles que apresentaram fragmento de aproximadamente 977 pb foram enviados para o NPT do CPqAM para serem sequenciados, sendo utilizado o iniciador *forward* da PCR e o BigDye Terminator Kit em sequenciador ABI3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

4.8 Genotipagem da região promotora do gene *IL-10*

A amplificação da região promotora do gene *IL-10* foi realizada por PCR utilizando os iniciadores específicos *forward* 5'-ATCCAAGACAACACTACTAA-3' e reverso 5'-TAAATATCCTCAAAGTTCT-3', previamente descritos na literatura (PALADINO et al., 2006). A reação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, USA) em um volume final de 25 µL contendo tampão de PCR 1X; 2,5 mM de MgCl₂; 300 µM de dNTP; 1,6% de dimetilsulfóxido (DMSO); 0,5 pmol de cada iniciador; 1 U de *Taq* DNA polimerase (BioTools) e aproximadamente 100 ng de DNA de cada sujeito. As condições da amplificação foram: 1) desnaturação inicial: 95°C por 3 minutos; 2) 30 ciclos: 95°C por 45 segundos; 56°C por 45

segundos; 72°C por 1 minuto; 3) extensão final: 72°C por 7 minutos. O produto de amplificação foi visualizado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio 0,1 µg/mL e fotodocumentado em transiluminador de luz UV. Aqueles que apresentaram fragmento de aproximadamente 600 pb foram enviados para o NPT do CPqAM para serem sequenciados, sendo utilizado o iniciador *forward* da PCR e o BigDye Terminator Kit em sequenciador ABI3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

4.9 Quantificação de sHLA-G

As formas solúveis da molécula HLA-G (*shedded* HLA-G1 e HLA-G5) foram quantificadas utilizando o RD194070100 sHLA-G ELISA (BioVendor, Laboratory Medicine, Czech Republic), que consiste em um ELISA do tipo sanduíche. Neste ensaio, calibradores e amostras foram incubados em poços de microplaca pré-revestidas com anticorpo monoclonal anti-sHLA-G. Após 20 horas de incubação e posterior lavagem, anticorpo monoclonal anti-β2 microglobulina humana marcado com peroxidase de rábano (*horseradish peroxidase* - HRP) é adicionado aos poços e a placa incubada por 60 minutos com sHLA-G de captura. Após outra etapa de lavagem, o conjugado HRP remanescente é colocado para reagir com uma solução de substrato (tetrametilbenzidina – TMB). A reação é interrompida pela adição de uma solução ácida e a absorbância do produto amarelo resultante é medida. A absorbância é proporcional à concentração de sHLA-G. A curva de calibração é construída, plotando-se os valores da absorbância contra concentrações dos calibradores (concentrações conhecidas), e concentrações de amostras desconhecidas são determinadas utilizando esta curva de calibração.

Os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante e os níveis totais de sHLA-G foram determinados por leitura de absorbância realizada em leitor de microplaca MULTISKAN FC (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), com densidade óptica de 450 nm e baseado em uma curva-padrão de 6 pontos (3,91; 7,81; 15,63; 31,25; 62,50; 125 Unidades/mL). Os resultados foram expressos em U/mL e o limite de detecção do ensaio foi de 0.6 U/mL.

4.10 Determinação do perfil de citocinas

As citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A) foram quantificadas por citometria de fluxo utilizando o *Cytometric Bead Array Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (BD Biosciences, USA). A quantificação foi realizada em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) e os resultados obtidos foram analisados utilizando o *software* FCAPArray™ (BD Biosciences). Os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante e os resultados foram expressos em pg/mL. Os limites de detecção para IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A foram 2,6 pg/mL, 4,9 pg/mL, 2,4 pg/mL, 4,5 pg/mL, 3,8 pg/mL, 3,7 pg/mL e 18,9 pg/mL, respectivamente.

4.11 Análise estatística (análise dos dados de polimorfismos genéticos, citocinas, sHLA-G e variáveis clínicas)

Todos os cromatogramas obtidos dos sequenciamentos de DNA foram analisados utilizando o programa SeqMan versão 7.0.0 (DNASTAR® Lasergene, Madison, WI, USA). As frequências genotípicas e alélicas foram estimadas utilizando o programa Genepop versão 4.0 (ROUSSET, 2008), sendo realizadas comparações com as frequências provenientes do grupo controle saudável. O teste exato de Fisher com correção de Levene foi aplicado no cálculo do número esperado de homocigotos e heterocigotos. As medidas das diferenças entre os grupos foram calculadas utilizando o teste exato de Fisher. O risco relativo foi estimado pelo cálculo do *Odds ratio* (OR) com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Aderências das proporções genotípicas ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) esperado foram estimadas utilizando o teste exato de Guo e Thompson disponível no Genepop (GUO; THOMPSON, 1992). Para avaliação do desequilíbrio de ligação entre os sítios polimórficos foi utilizado o programa Arlequin versão 3.5.1.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) que calcula o desequilíbrio de ligação para cada grupo e a população de estudo como um todo. Diante de desequilíbrio de ligação positivo entre alelos dos polimorfismos estudados, mas com fase gamética desconhecida, o par haplotípico mais provável para cada indivíduo do estudo foi determinado utilizando dois métodos computacionais independentes. O método Phase foi aplicado com o programa Phase versão 2.1 (STEPHENS; SMITH;

DONNELLY, 2001). Em seguida, o algoritmo de maximização de expectativa foi utilizado no programa Arlequin para estimar frequências de haplótipos. Foram considerados para análise os haplótipos concordantes em ambos métodos e com probabilidade superior a 98%. Os indivíduos que apresentaram inferências discordantes foram excluídos da análise.

As variáveis contínuas foram expressas em médias e desvio padrão (DP) ou medianas e intervalo interquartil (IQR). As variáveis categóricas foram expressas em valor absoluto e relativo. Foram realizados testes para avaliar normalidade nas variáveis contínuas (Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro-Wilk). Assumindo que os dados quantitativos não seguiram distribuição normal, foram aplicados testes não-paramétricos. Para avaliar diferenças na concentração das citocinas e sHLA-G entre os grupos estudados, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis e/ou teste de Mann-Whitney U. O teste de Wilcoxon foi usado para avaliar diferenças na concentração das citocinas entre os pacientes no estudo longitudinal. O teste do coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar associação entre variáveis quantitativas. Análise multivariada foi realizada usando modelo de regressão linear para avaliar associação das citocinas com SLEDAI-2K e entre as citocinas no grupo de pacientes, assim como a contribuição de cada manifestação clínica sobre sHLA-G.

Para os estudos de associação genética, o tamanho da amostra foi calculado pelo programa Epi Info para Windows versão 7, módulo StatCalc. Aplicamos poder do teste de 80%, nível de significância de 5%, 3 controles para cada caso, proporção de expostos entre os casos de 35% e OR de 2.5.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software, Inc.) e o programa SPSS versão 20 (SAS Institute, Cary, NC), sendo consideradas significantes as diferenças com *P*-valor < 0.05.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil clínico, laboratorial e demográfico dos pacientes com LESi

Dos 51 pacientes, 47 (92%) eram do sexo feminino e a mediana da idade foi de 15 anos (IQR 5-20). A mediana da duração da doença foi de 3 anos (IQR 1-9). No momento da coleta de sangue, 26 pacientes apresentavam doença em atividade (SLEDAI-2K \geq 4), com mediana de escore de 6 (IQR 4-27), e 25 apresentavam doença inativa, com mediana de escore de 2 (IQR 0-2). Artrite (82%), nefrite (64%), alterações hematológicas (56%), e serosite (48%) foram as manifestações clínicas mais frequentes. Todos os pacientes estavam em uso de hidroxicloroquina, e 31 (62%) faziam uso de prednisona, 25 (49%) de micofenolato de mofetila, 17 (33%) de azatioprina e apenas 4 (8%) faziam uso do metotrexato. As manifestações clínicas, laboratoriais e demográficas dos pacientes estão demonstradas na Tabela 1.

A distribuição da faixa etária dos pacientes foi homogênea com a mediana da idade (15 anos). Este achado sugere que possíveis influências hormonais no quadro clínico e imunológico da doença foram uniformes, uma vez que apenas 2 meninos e 8 meninas na pré-menarca foram incluídas no nosso estudo.

Tabela 1 – Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com LESi incluídos no estudo

Variáveis	LESi (n = 51)
Sexo	
Feminino	47 (92%)
Idade (anos) ^a	15 (5–20)
Duração da doença (anos) ^a	3 (1–9)
SLEDAI-2K^a	
Doença ativa (n = 26)	6 (4–27)
Doença inativa (n =25)	2 (0–2)
Manifestações clínicas	
Rash malar	17 (34%)
Rash discoide	5 (10%)
Fotossensibilidade	13 (26%)
Úlceras	11 (22%)
Nefrite	32 (64%)
Serosite	24 (48%)
Artrite	41 (82%)
Alterações hematológicas	28 (56%)
Alterações neuropsiquiátricas	6 (12%)
Laboratório	
FAN	51 (100%)
Anti-dsDNA	33 (66%)
Consumo de C3	34 (68%)
Consumo de C4	29 (57%)
Tratamento (nos últimos 3 meses)	
Hidroxicloroquina	51 (100%)
Prednisona	31 (61%)
Micofenolato de mofetila	25 (49%)
Azatioprina	17 (33%)
Metotrexato	4 (8%)

Fonte: O autor.

Legenda: LESi (lúpus eritematoso sistêmico de início na infância); SLEDAI-2K (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000*); FAN (fator anti-núcleo); anti-dsDNA (anti-DNA de fita dupla).

^aMediana (intervalo interquartil).

5.2 Perfil de citocinas

Para o estudo do perfil de citocinas, o grupo controle foi constituído por 47 sujeitos com mediana da idade de 15 anos (IQR 6-21), desses 39 (83%) eram do sexo feminino. Pacientes e controles saudáveis foram homogêneos em relação à idade ($P = 0.800$) e sexo ($P = 0.222$).

Níveis plasmáticos de citocinas sabidamente relacionados ao perfil Th1, Th2, Th17 e Treg dos pacientes com LESi e do grupo controle saudável estão mostrados na Tabela 2. IL-6 ($P = 0.0002$) e IL-10 ($P = 0.0002$) apresentaram aumento significativo em crianças e adolescentes com LESi quando comparado com grupo controle saudável. Nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis plasmáticos das citocinas IL-17A, IFN- γ , TNF, IL-4 e IL-2 entre os pacientes com LESi e grupo controle saudável (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação da concentração plasmática das citocinas entre pacientes com LESi e grupo controle

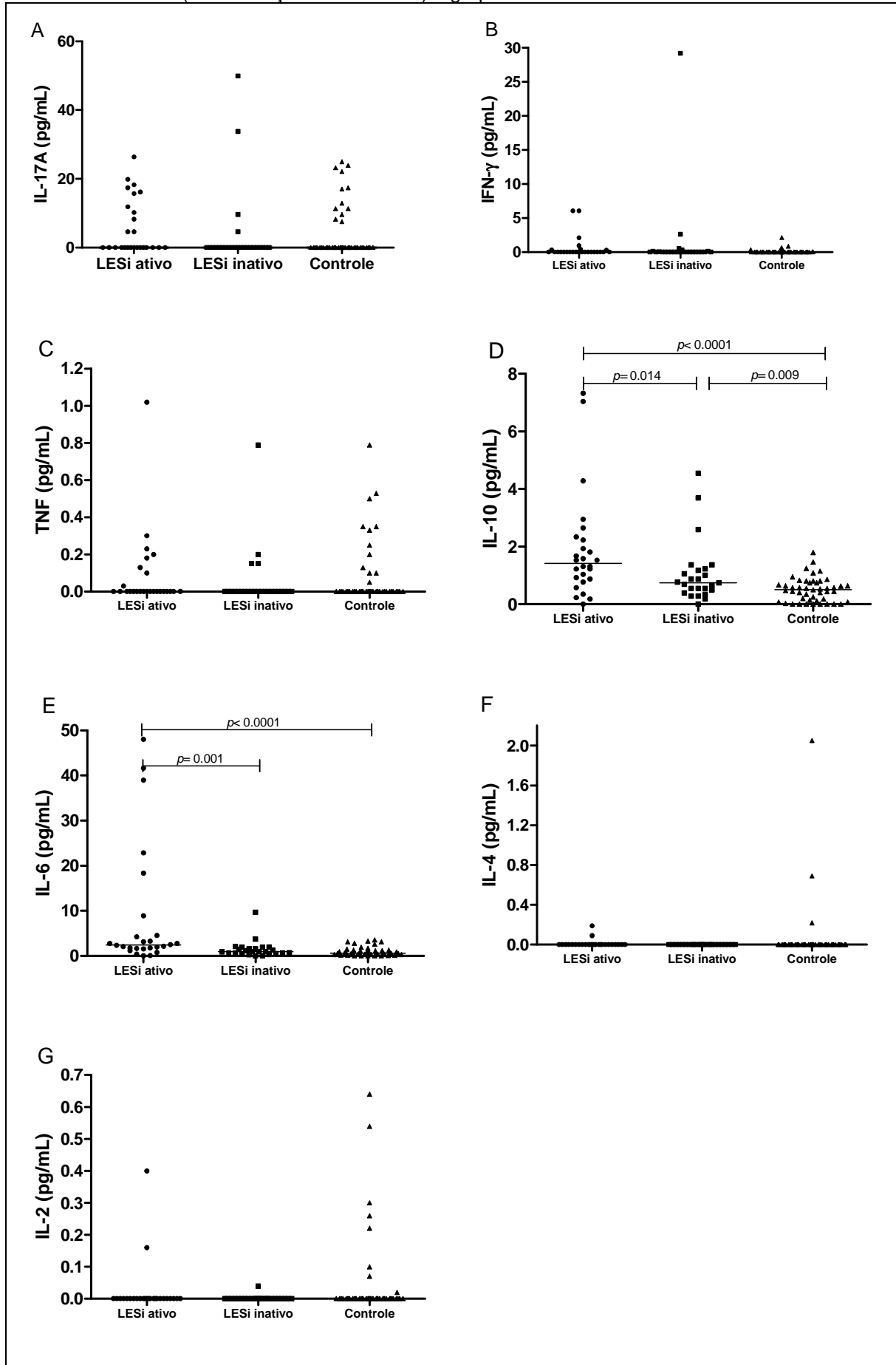
Citocinas (pg/mL)		LESi (n=51)	Controle (n=47)	P-valor
IL-17A	Média \pm DP	4.93 \pm 10.10	4.04 \pm 7.65	
	Mediana (IQR)	0.00 (0.00-49.94)	0.00 (0.00-24.98)	0.718
IFN- γ	Média \pm DP	0.96 \pm 4.22	0.10 \pm 0.35	
	Mediana (IQR)	0.00 (0.00-29.21)	0.00 (0.00-2.14)	0.071
TNF	Média \pm DP	0.07 \pm 0.19	0.08 \pm 0.17	
	Mediana (IQR)	0.00 (0.00-1.02)	0.00 (0.00-0.79)	0.742
IL-10	Média \pm DP	1.47 \pm 1.54	0.51 \pm 0.42	
	Mediana (IQR)	1.04 (0.00-7.32)	0.50 (0.00-1.80)	0.0002
IL-6	Média \pm DP	5.01 \pm 10.46	0.93 \pm 0.95	
	Mediana (IQR)	1.64 (0.00-48.01)	0.58 (0.00-3.58)	0.0002
IL-4	Média \pm DP	0.01 \pm 0.03	0.06 \pm 0.31	
	Mediana (IQR)	0.00 (0.00-0.19)	0.00 (0.00-2.05)	0.544
IL-2	Média \pm DP	0.01 \pm 0.06	0.05 \pm 0.13	
	Mediana (IQR)	0.00 (0.00-0.40)	0.00 (0.00-0.64)	0.079

Fonte: O autor.

Legenda: LESi (lúpus eritematoso sistêmico de início na infância); IL-17A (interleucina-17); IFN- γ (interferon-gama); TNF (fator de necrose tumoral); IL-10 (interleucina-10); IL-6 (interleucina-6); IL-4 (interleucina-4); IL-2 (interleucina-2); DP (desvio padrão), IQR (intervalo interquartil). P -valor calculado considerando a mediana, devido à distribuição não normal dos dados.

Após estratificação dos pacientes em doença ativa (SLEDAI-2K \geq 4) e doença inativa (SLEDAI-2K $<$ 4), foi observado aumento significativo da IL-10 em pacientes com doença ativa quando comparados com pacientes com doença inativa ($P = 0.014$) e grupo controle saudável ($P < 0.0001$). Também foi observado nível significativamente maior da IL-10 nos pacientes com doença inativa quando comparado com o grupo controle ($P = 0.009$). Já em relação a IL-6, os pacientes com doença ativa apresentaram aumento significativo quando comparado com os pacientes com doença inativa ($P = 0.001$) e grupo controle saudável ($P < 0.0001$). Não foi observado diferença entre os pacientes com doença inativa e grupo controle. Não foi encontrada diferença significativa com as demais citocinas entre os pacientes com doença ativa, inativa e grupo controle. A Figura 8 demonstra os níveis plasmáticos das citocinas nos pacientes com doença ativa, inativa e grupo controle.

Figura 8 – Perfil de citocinas Th1, Th2, Th17 e Treg em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância (com doença ativa e inativa) e grupo controle



Fonte: O autor.

Legenda: LESi (lúpus eritematoso sistêmico de início na infância); IL-17A (interleucina-17); IFN-γ (interferon-gama); TNF (fator de necrose tumoral); IL-10 (interleucina-10); IL-6 (interleucina-6); IL-4 (interleucina-4); IL-2 (interleucina-2).

No estudo de seguimento longitudinal, no qual coleta de sangue foi realizada em 10 pacientes em dois momentos diferentes (doença ativa e doença inativa ou vice-versa), foi observado nível significativamente aumentado durante a atividade da doença da IL-10 ($P = 0.013$), IL-6 ($P = 0.022$) e IL-17A ($P = 0.041$) quando comparado com o período de doença inativa (Tabela 3).

A Tabela 4 mostra as correlações das citocinas com escore do SLEDAI-2K. A fim de avaliar associações independentes das citocinas com SLEDAI-2K, análise multivariada foi utilizada pelo método de regressão linear. As variáveis independentes que foram consideradas no modelo multivariado foram aquelas que apresentaram P -valor < 0.20 na análise univariada (Tabela 4). No modelo final, IL-10 ($P = 0.01$; IC 95% 0.021-0.150) e IL-6 ($P = 0.002$; IC 95% 0.006-0.025) foram confirmadas como fatores independentes para aumento no escore do SLEDAI-2K.

Nenhuma associação estatística significativa foi encontrada entre as várias citocinas analisadas e uso de medicações pelos pacientes (dados não mostrados).

Tabela 3 – Níveis plasmáticos de citocinas em 10 pacientes em dois momentos diferentes: doença ativa e doença inativa

Citocinas (pg/mL)		LESi ativo	LESi inativo	P -valor
IL-17A	Média \pm DP	6.14 \pm 6.70	0.46 \pm 1.47	
	Mediana (IQR)	4.64 (0.00–17.44)	0.00 (0.00–4.64)	0.041
IFN- γ	Média \pm DP	1.31 \pm 2.52	0.00 \pm 0.00	
	Mediana (IQR)	0.00 (0.00–6.06)	0.00 (0.00–0.00)	0.102
TNF	Média \pm DP	0.16 \pm 0.33	0.00 \pm 0.00	
	Mediana (IQR)	0.00 (0.00–1.02)	0.00 (0.00–0.00)	0.109
IL-10	Média \pm DP	2.85 \pm 2.53	0.79 \pm 0.44	
	Mediana (IQR)	1.94 (0.58–7.32)	0.79 (0.12–1.58)	0.013
IL-6	Média \pm DP	13.64 \pm 17.13	1.33 \pm 0.86	
	Mediana (IQR)	5.52 (0.82-48.01)	1.32 (0.24-2.78)	0.022
IL-4	Média \pm DP	0.03 \pm 0.06	0.00 \pm 0.00	
	Mediana (IQR)	0.00 (0.00–0.19)	0.00 (0.00–0.00)	0.180
IL-2	Média \pm DP	0.04 \pm 0.13	0.00 \pm 0.00	
	Mediana (IQR)	0.00 (0.00–0.40)	0.00 (0.00–0.00)	0.317

Fonte: O autor.

Legenda: LESi (lúpus eritematoso sistêmico de início na infância); IL-17A (interleucina-17); IFN- γ (interferon-gama); TNF (fator de necrose tumoral); IL-10 (interleucina-10); IL-6 (interleucina-6); IL-4 (interleucina-4); IL-2 (interleucina-2); DP (desvio padrão), IQR (intervalo interquartil). P -valor calculado baseado na mediana, devido à distribuição não normal dos dados.

Tabela 4 – Correlações das citocinas com SLEDAI-2K em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância

Citocinas	ρ	P -valor
IL-17A	0.232	0.102
IFN- γ	0.010	0.945
TNF	0.166	0.246
IL-10	0.383	0.005
IL-6	0.462	0.001
IL-4	0.295	0.036
IL-2	0.182	0.195

Fonte: O autor.

Legenda: * $P < 0.20$; SLEDAI-2K (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* 2000); ρ (coeficiente de correlação rho de Spearman); IL-17A (interleucina-17); IFN- γ (interferon-gama); TNF (fator de necrose tumoral); IL-10 (interleucina-10); IL-6 (interleucina-6); IL-4 (interleucina-4); IL-2 (interleucina-2).

5.3 Polimorfismos na região promotora do gene *TNF*

Para o estudo dos polimorfismos genéticos do gene *TNF*, o grupo controle foi constituído de 145 sujeitos saudáveis com mediana da idade de 14 anos (IQR 12-19), desses 87 (60%) eram do sexo feminino. Foram analisados cinco sítios polimórficos da região promotora do *TNF* nas posições -1031 T>C (rs1799964), -863 C>A (rs1800630), -857 C>T (rs1799724), -308 G>A (rs1800629) e -238 G>A (rs361525) relativas ao ponto de início da transcrição. Esses polimorfismos já foram descritos em diferentes populações (CASTRO-MARTÍNEZ et al., 2014).

Nenhuma diferença significativa foi encontrada nas frequências alélicas e genóticas dos polimorfismos acima descritos entre pacientes com LESi e grupo controle. Observamos apenas aumento não significativo na frequência do alelo -308 A nos pacientes quando comparado com grupo controle (14.7% versus 8.3%, $P = 0.082$) e ausência do genótipo -1031 CC nos pacientes, também sem significância estatística (0% versus 7.6%, $P = 0.070$). Os genótipos de todos os sítios polimórficos detectados adequaram-se as expectativas do EHW ($P > 0.05$), tanto nos pacientes quanto no grupo controle. A Tabela 5 descreve as frequências genéticas dos polimorfismos da região promotora do *TNF* encontrados nos dois grupos analisados.

Tabela 5 - Frequências alélicas e genotípicas dos cinco sítios polimórficos (-1031 T>C, -863 C>A, -857 C>T, -308 G>A, e -238 G>A) encontrados na região promotora do *TNF* e dos dois sítios polimórficos (-1082 G>A e -819 C>T) encontrados na região promotora do *IL-10* em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância e grupo controle. Probabilidade de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg também é mostrado

Sítios polimórficos	Pacientes		Controles		P-valor	OR	IC 95%
	Frequência absoluta	Frequência relativa	Frequência absoluta	Frequência relativa			
<i>(continua)</i>							
Região promotora do <i>TNF</i>							
-1031 T>C	n = 51		n = 145				
C	20	0.196	79	0.272	0.146	0.65	0.37–1.13
T	82	0.804	211	0.728	0.146	1.53	0.88–2.67
CC	0	0.000	11	0.076	0.070	0.11	0.01–1.96
TC	20	0.392	57	0.393	1.000	1.00	0.52–1.91
TT	31	0.608	77	0.531	0.414	1.37	0.71–2.62
PEHW	0.175		1.000				
-863 C>A	n = 51		n = 145				
A	16	0.157	57	0.197	0.460	0.76	0.41–1.40
C	86	0.843	233	0.803	0.460	1.31	0.72–2.41
AA	0	0.000	7	0.048	0.193	0.18	0.01–3.20
CA	16	0.314	43	0.297	0.860	1.08	0.54–2.16
CC	35	0.686	95	0.655	0.733	1.15	0.58–2.28
PEHW	1.332		0.436				
-857 C>T	n = 51		n = 145				
C	89	0.873	265	0.914	0.244	0.64	0.32–1.32
T	13	0.127	25	0.086	0.244	1.55	0.76–3.16
CC	39	0.765	121	0.834	0.295	0.64	0.29–1.41
CT	11	0.216	23	0.159	0.391	1.46	0.65–3.26
TT	1	0.019	1	0.007	0.454	2.88	0.18–46.94
PEHW	1.000		1.000				
-308 G>A	n = 51		n = 145				
A	15	0.147	24	0.083	0.082	1.92	0.96–3.80
G	87	0.853	266	0.917	0.082	0.52	0.26–1.04
AA	2	0.040	1	0.007	0.166	5.88	0.52–66.29
GA	11	0.216	22	0.152	0.286	1.54	0.68–3.45
GG	38	0.744	122	0.841	0.143	0.55	0.25–1.19
PEHW	0.276		1.000				

Tabela 5 - Frequências alélicas e genotípicas dos cinco sítios polimórficos (-1031 T>C, -863 C>A, -857 C>T, -308 G>A, e -238 G>A) encontrados na região promotora do *TNF* e dos dois sítios polimórficos (-1082 G>A e -819 C>T) encontrados na região promotora do *IL-10* em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância e grupo controle. Probabilidade de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg também é mostrado

Sítios polimórficos	Pacientes		Controles		P-valor	OR	IC 95%
	Frequência absoluta	Frequência relativa	Frequência absoluta	Frequência relativa			
<i>(conclusão)</i>							
Região promotora do <i>TNF</i>							
-238 G>A	n = 51		n = 145				
A	3	0.029	20	0.069	0.218	0.41	0.12–1.40
G	99	0.971	270	0.931	0.218	2.44	0.71–8.41
AA	0	0.000	0	0.000	-	-	-
GA	3	0.059	20	0.138	0.204	0.39	0.11–1.37
GG	48	0.941	125	0.862	0.204	2.56	0.72–9.01
PEHW	1.000		1.000				
Região promotora do <i>IL-10</i>							
-1082 G>A	n = 51		n = 143				
A	71	0.696	186	0.650	0.465	1.23	0.76–2.00
G	31	0.304	100	0.345	0.465	0.81	0.50–1.32
AA	24	0.471	63	0.440	0.745	1.13	0.60–2.14
GA	23	0.451	60	0.420	0.743	1.14	0.60–2.16
GG	4	0.078	20	0.140	0.326	0.52	0.17–1.61
PEHW	1.000		1.000				
-819 C>T	n = 51		n = 143				
C	64	0.627	184	0.643	0.811	0.93	0.58–1.49
T	38	0.373	102	0.357	0.811	1.07	0.67–1.71
CC	20	0.392	60	0.420	0.869	0.89	0.46–1.71
CT	24	0.471	64	0.447	0.870	1.10	0.58–2.08
TT	7	0.137	19	0.133	1.000	1.04	0.41–2.64
PEHW	1.000		1.000				

Fonte: O autor.

Legenda: OR (*Odds ratio*); IC 95% (intervalo de confiança de 95%); PEHW (probabilidade de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg).

Possíveis associações das manifestações clínicas e laboratoriais dos pacientes com LESi com polimorfismos da região promotora do *TNF* também foram analisadas. Associação significativa foi encontrada entre o alelo -863 A e serosite; demonstrada tanto pela relação entre o alelo -863 A e presença de serosite ($P =$

0.027, OR = 4.17, IC 95% = 1.24-13.98), quanto pela relação entre genótipo -863 AA + AC e serosite ($P = 0.014$, OR = 5.75, IC 95% = 1.52-21.74).

Análise do desequilíbrio de ligação foi significativa ($P < 0.05$) em 3 (30%) dos 10 pares possíveis para os sítios polimórficos na região promotora do *TNF* nos pacientes com LESi e em 4 (25%) dos 10 pares possíveis no grupo controle. Nenhuma diferença significativa foi observada nas frequências dos haplótipos entre pacientes e grupo controle (Tabela 6).

Não foi observada associação entre concentração plasmática do TNF e sujeitos portadores do alelo -308 A (considerado como alto produtor de TNF) tanto no grupo dos pacientes quanto no grupo controle (dados não mostrados).

Tabela 6 – Frequência haplotípica da região promotora do gene *TNF* em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico de início na infância e grupo controle

Haplótipos	LESi		Grupo controle		P-valor	OR	IC 95%
	n	Freq	N	Freq			
CACGG	16	0.170	57	0.204	0.549	0.80	0.44-1.50
CCCGG	1	0.011	3	0.011	1.000	0.99	0.10-9.70
CCCGA	3	0.032	15	0.054	0.579	0.58	0.16-2.10
TCCGG	54	0.574	161	0.575	1.000	1.00	0.62-1.60
TCCAG	11	0.117	21	0.075	0.207	1.60	0.76-3.50
TCTGG	9	0.096	23	0.082	0.673	1.20	0.53-2.70
TOTAL	94		280				

Fonte: O autor.

Legenda: LESi (lúpus eritematoso sistêmico de início na infância); Freq (frequência relativa); OR (*Odds ratio*); IC 95% (intervalo de confiança de 95%).

5.4 Polimorfismos na região promotora do gene *IL-10*

Para o estudo dos polimorfismos genéticos do gene *IL-10*, o grupo controle foi constituído de 143 sujeitos saudáveis com mediana da idade de 14 anos (IQR 12-19), desses 87 (61%) eram do sexo feminino. Foram analisados dois sítios polimórficos da região promotora do *IL-10* nas posições -1082 G>A (rs1800896) e -819 C>T (rs1800871) designados a partir do sítio de início da transcrição. Esses polimorfismos já foram descritos em diferentes populações (REES et al., 2002). Nenhuma diferença significativa foi encontrada nas frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos acima descritos entre os pacientes com LESi e grupo controle. Os genótipos de todos os sítios polimórficos detectados adequaram-se as expectativas do EHW ($P > 0.05$) tanto nos pacientes quanto no grupo controle. Não foi observado associação entre manifestações clínicas da doença e genótipos da

região promotora do *IL-10*. A Tabela 5 descreve as frequências genéticas dos polimorfismos da região promotora do *IL-10* encontrados nos dois grupos analisados.

Análise do desequilíbrio de ligação foi significativa ($P < 0.05$) em todos os pares possíveis para os sítios polimórficos na região promotora do *IL-10* tanto nos pacientes quanto no grupo controle. Nenhuma diferença significativa foi observada nas frequências dos haplótipos entre pacientes e grupo controle (Tabela 7).

Tabela 7 – Frequência haplotípica da região promotora do gene *IL-10* em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico de início na infância e grupo controle

Haplótipos	LESi		Grupo controle		P-valor	OR	IC 95%
	n	Freq	N	Freq			
GCC	31	0.304	100	0.350	0.465	0.81	0.50-1.30
ACC	33	0.324	84	0.294	0.616	1.20	0.71-1.90
ATA	38	0.373	102	0.357	0.811	1.10	0.67-1.70
TOTAL	102		286				

Fonte: O autor.

Legenda: LESi (lúpus eritematoso sistêmico de início na infância); Freq (frequência relativa); OR (*Odds ratio*); IC 95% (intervalo de confiança de 95%).

5.5 Polimorfismos na 3'UTR do gene *HLA-G*

Para o estudo dos polimorfismos genéticos na 3'UTR do gene *HLA-G*, o grupo controle foi constituído de 144 sujeitos saudáveis com mediana da idade de 14 anos (IQR 12-19), desses 89 (62%) eram do sexo feminino. Foram analisados oito sítios polimórficos, a saber: 14 pb Del>Ins (rs371194629), +3003 T>C (rs1707), +3010 C>G (rs1710), +3027 C>A (rs17179101), +3035 C>T (rs17179108), +3142 G>C (rs1063320), +3187 A>G (rs9380142) e +3196 C>G (rs1610696). Esses polimorfismos já foram descritos no Brasil (CASTELLI et al., 2010) e em outras populações (MARTELLI-PALOMINO et al., 2013). Nenhuma diferença significativa foi encontrada nas frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos acima descritos entre os pacientes com LESi e grupo controle. Foi observada apenas discreta redução na frequência do genótipo 14 pb Ins/Ins (6% versus 17,4%, $P = 0.060$) e do alelo +3187 A (64,4% versus 74,%, $P = 0.079$) nos pacientes com LESi quando comparados com grupo controle. Os genótipos de todos os sítios polimórficos detectados adequaram-se as expectativas do EHW nos pacientes ($P > 0.05$), no entanto, o polimorfismo +3035 C>T no grupo controle não se adequou ao

EHW, exibindo déficit de heterozigose ($P = 0.004$). As frequências alélicas e genóticas dos sítios polimórficos na 3'UTR do *HLA-G* estão descritas na Tabela 8.

Análise do desequilíbrio de ligação foi significativa ($P < 0.05$) em 21 (75%) dos 28 pares possíveis dos sítios polimórficos na 3'UTR do *HLA-G* nos pacientes com LESi e em 26 (92.8%) dos 28 pares possíveis no grupo controle. Nenhuma diferença significativa foi observada na frequência dos haplótipos entre pacientes com LESi e grupo controle (dados não mostrados). Em seguida, foram analisadas associações entre manifestações clínicas e laboratoriais dos pacientes com LESi e polimorfismos na 3'UTR do *HLA-G*. Associação significativa foi detectada entre alelo 14 pb Del ($P = 0.028$, OR = 2.76, IC 95% 1.17-6.52) e genótipo 14 pb Del/Del ($P = 0.006$, OR = 8.00, IC 95% 1.57-40.65) com nefrite lúpica. Em relação aos haplótipos, nenhum haplótipo na 3'UTR do *HLA-G* apresentou associação com manifestações clínicas do LESi (Tabela 9). Considerando que as frequências dos SNPs 14 pb, +3010, +3142 e +3187 foram diferentes entre pacientes com LESi e grupo controle, embora não significante, e em estudo prévio realizado pelo nosso grupo o haplótipo 14 pb Del/+3010C/+3142G/+3187A apresentou associação com susceptibilidade para LES nos adultos (LUCENA-SILVA et al., 2013), foi avaliado se sequência consenso em dose dupla (combinação de UTR-1, UTR-4 e UTR-6) apresentava associação com susceptibilidade e gravidade nos pacientes com LESi. A sequência consenso não apresentou associação com susceptibilidade para desenvolvimento da doença, no entanto, apresentou associação com nefrite lúpica ($P = 0.027$) e serosite ($P = 0.047$) (Tabela 9).

5.6 Expressão do HLA-G solúvel

Em relação à produção do sHLA-G, não foi observada diferença significativa entre os níveis plasmáticos nos pacientes com LESi (56.02 U/ml, IQR 37.54-75.41) e grupo controle (49.2 U/ml, IQR 27.84-154.4, $P = 0.952$). Também não foi observado correlação entre sHLA-G e o escore de atividade de doença SLEDAI-2K, assim como associação entre determinado genótipo ou haplótipo *versus* sHLA-G (dados não mostrados). No entanto, quando o grupo de pacientes foi estratificado de acordo com manifestações clínicas, foi observado nos pacientes com manifestações hematológicas menor concentração plasmática de sHLA-G (47.08 U/ml, IQR 34.15-

61.56) quando comparado com aqueles sem manifestações hematológicas (65.26 U/ml, IQR 47.69-102.60, $P = 0.013$) (Figura 9).

A fim de explorar a relação entre manifestação clínica e sHLA-G, regressão linear múltipla foi realizada. O modelo final foi representado pela seguinte equação: $sHLA-G = 81.79 + 56.62 \times X_1 - 36.90 \times X_2$, onde $X_1 =$ úlceras e $X_2 =$ envolvimento hematológico, a qual prediz associação entre envolvimento hematológico e baixa concentração de sHLA-G e úlceras com alta concentração de sHLA-G.

Tabela 8 – Frequências alélicas e genotípicas dos oito sítios polimórficos (14 pb Ins>Del, +3003 T>C, +3010 C>G, +3027 C>A, +3035 C>T, +3142 G>C, +3187 G>A e +3196 G>C) encontrados na região 3' não traduzida em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância e grupo controle. Probabilidade de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg também é mostrado

(continua)

Sítios polimórficos	Pacientes		Controles		P-valor	OR	IC 95%
	Frequência absoluta	Frequência relativa	Frequência absoluta	Frequência relativa			
14 pb*	n = 50		n = 144				
Ins	35	0.350	121	0.420	0.237	0.74	0.46-1.19
Del	65	0.650	167	0.580	0.237	1.34	0.83-2.15
Del/Del	18	0.360	48	0.333	0.732	1.12	0.57-2.20
Ins/Del	29	0.580	71	0.493	0.326	1.42	0.74-2.71
Ins/Ins	3	0.060	25	0.174	0.060	0.30	0.08-1.05
PEHW	0.070		1.000				
+3003*	n = 50		n = 144				
C	10	0.100	20	0.069	0.384	1.48	0.67-3.30
T	90	0.900	268	0.931	0.384	0.67	0.30-1.48
CC	0	0.000	1	0.007	1.000	0.94	0.03-26.65
CT	10	0.200	18	0.125	0.242	1.75	0.74-4.09
TT	40	0.800	125	0.868	0.255	0.60	0.26-1.41
PEHW	1.000		0.507				
+3010*	n = 50		n = 144				
C	53	0.530	180	0.625	0.098	0.67	0.42-1.07
G	47	0.470	108	0.375	0.098	1.47	0.93-2.34
CC	13	0.260	53	0.368	0.224	0.60	0.29-1.23
CG	27	0.540	74	0.514	0.869	1.11	0.58-2.11
GG	10	0.200	17	0.118	0.159	1.86	0.79-4.40
PEHW	0.776		0.288				
+3027*	n = 50		n = 144				
A	4	0.040	17	0.059	0.611	0.66	0.21-2.02
C	96	0.960	271	0.941	0.611	1.50	0.49-4.58
AA	0	0.000	0	0.000	-	-	-
AC	4	0.080	17	0.118	0.600	0.64	0.20-2.03
CC	46	0.920	127	0.882	0.600	1.53	0.49-4.81
PEHW	1.000		1.000				
+3035*	n = 50		n = 144				
C	85	0.850	237	0.823	0.643	1.21	0.65-2.28
T	15	0.150	51	0.177	0.643	0.82	0.43-1.53
CC	36	0.720	103	0.715	1.000	1.02	0.50-2.09
CT	13	0.260	31	0.215	0.558	1.28	0.60-2.70
TT	1	0.020	10	0.070	0.294	0.27	0.03-2.19
PEHW	1.000		0.004				

Tabela 8 – Frequências alélicas e genotípicas dos oito sítios polimórficos (14 pb Ins>Del, +3003 T>C, +3010 C>G, +3027 C>A, +3035 C>T, +3142 G>C, +3187 G>A e +3196 G>C) encontrados na região 3' não traduzida em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância e grupo controle. Probabilidade de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg também é mostrado

(conclusão)

Sítios polimórficos	Pacientes		Controles		P-valor	OR	IC 95%
	Frequência absoluta	Frequência relativa	Frequência absoluta	Frequência relativa			
+3142*	n = 50		n = 144				
C	47	0.470	108	0.375	0.098	1.47	0.93-2.34
G	53	0.530	180	0.625	0.098	0.67	0.42-1.07
CC	10	0.200	17	0.118	0.159	1.86	0.79-4.40
CG	27	0.540	74	0.514	0.869	1.11	0.58-2.11
GG	13	0.260	53	0.368	0.224	0.60	0.29-1.23
PEHW	0.776		0.291				
+3187*	n = 45		n = 144				
A	58	0.644	215	0.746	0.079	0.61	0.37-1.02
G	32	0.356	73	0.254	0.079	1.62	0.97-2.69
AA	19	0.422	80	0.556	0.127	0.58	0.29-1.15
AG	20	0.444	55	0.382	0.487	1.29	0.65-2.54
GG	6	0.134	9	0.062	0.201	2.30	0.77-6.88
PEHW	1.000		1.000				
+3196*	n = 43		n = 144				
C	62	0.721	201	0.698	0.788	1.11	0.65-1.90
G	24	0.279	87	0.302	0.788	0.89	0.52-1.52
CC	22	0.512	66	0.458	0.602	1.23	0.62-2.44
CG	18	0.419	69	0.479	0.601	0.78	0.39-1.55
GG	3	0.069	9	0.063	1.000	1.12	0.29-4.35
PEHW	1.000		0.119				

Fonte: O autor.

Legenda: OR (*Odds ratio*); IC 95% (intervalo de confiança de 95%); PEHW (probabilidade de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg). *Nesses polimorfismos, menor número de pacientes foi avaliado.

Tabela 9 – Associações dos haplótipos na região 3' não traduzida do *HLA-G* com manifestações clínicas e laboratoriais dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância (regressão logística univariada)

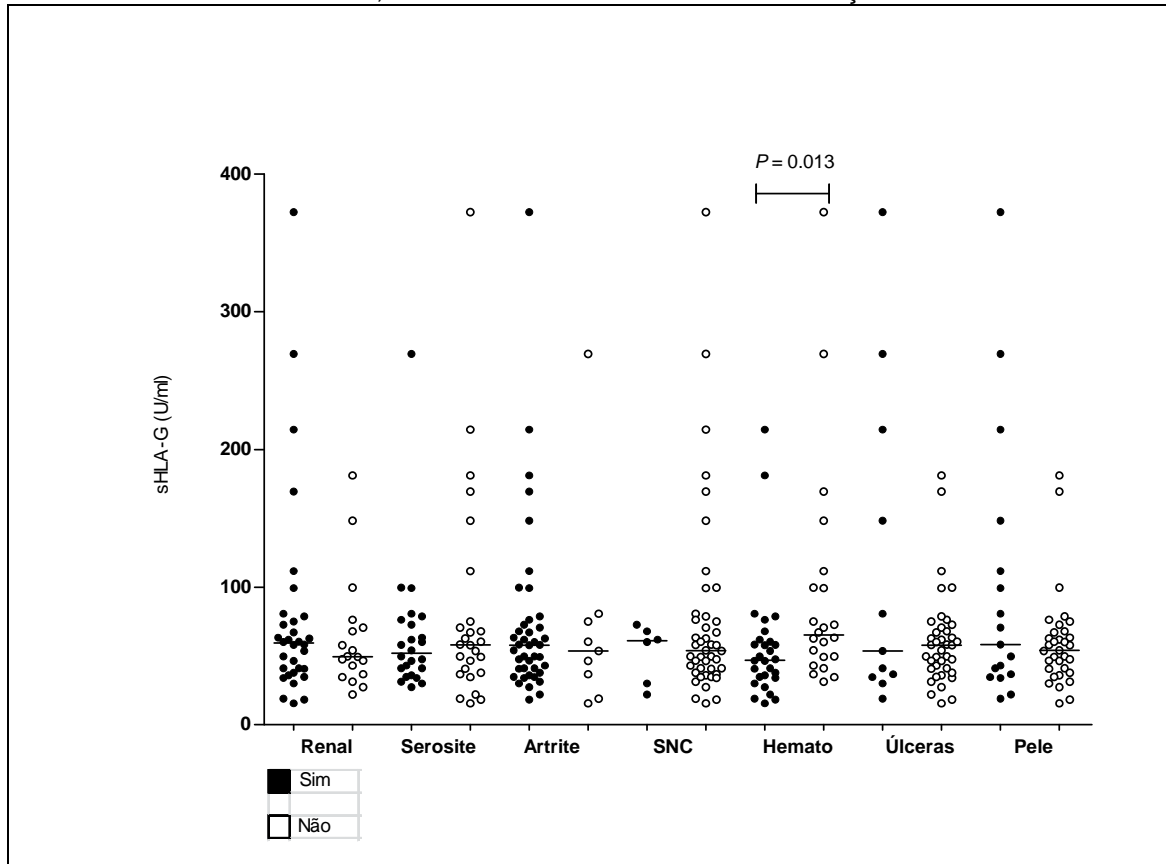
Variáveis	Sim	Não	P-valor	OR (IC 95%)	Variáveis	Sim	Não	P-valor	OR (IC 95%)
Nefrite					Artrite				
UTR-1	20	6	0.068	2.72 (0.97-8.50)	UTR-1	20	6	0.478	0.65 (0.20-2.21)
UTR-2	7	9	0.084	0.37 (0.12-1.14)	UTR-2	15	1	0.180	4.24 (0.74-80.20)
UTR-3	7	4	0.943	1.05 (0.29-4.35)	UTR-3	10	1	0.392	2.55 (0.43-48.91)
UTR-4	4	1	0.421	2.51 (0.35-50.53)	UTR-4	4	1	0.937	0.91 (0.12-18.63)
UTR-5	4	5	0.238	0.43 (0.10-1.77)	UTR-5	7	2	0.770	0.78 (0.16-5.65)
UTR-6	2	1	0.884	1.20 (0.11-26.54)	UTR-6	2	1	0.516	0.44 (0.04-9.90)
UTR-7	2	1	0.884	1.20 (0.11-26.54)	UTR-7	1	2	0.069	0.10 (0.00-1.12)
UTR-1/-4/-6	26	8	0.027	3.10 (1.17-8.80)	UTR-1/-4/-6	26	8	0.329	0.56 (0.17-1.79)
Serosite					SNC				
UTR-1	15	11	0.473	1.42 (0.55-3.77)	UTR-1	5	21	0.280	2.10 (0.53-8.32)
UTR-2	6	10	0.196	0.47 (0.14-1.44)	UTR-2	2	14	0.912	0.91 (0.13-4.16)
UTR-3	3	8	0.088	0.29 (0.06-1.11)	UTR-3	2	9	0.610	1.56 (0.21-7.55)
UTR-4	4	1	0.225	4.00 (0.56-80.37)	UTR-4	0	5	1.000	-
UTR-5	5	4	0.820	1.18 (0.29-5.12)	UTR-5	1	8	0.835	0.79 (0.04-5.13)
UTR-6	3	0	0.241	-	UTR-6	0	3	1.000	-
UTR-7	2	1	0.609	1.89 (0.17-41.78)	UTR-7	0	3	1.000	-
UTR-1/-4/-6	22	12	0.047	2.59 (1.03-6.77)	UTR-1/-4/-6	5	29	0.750	1.24 (0.32-4.87)
Rash malar					Úlceras				
UTR-1	9	17	0.723	1.20 (0.43-3.28)	UTR-1	6	20	0.892	0.93 (0.29-2.77)
UTR-2	6	10	0.595	1.37 (0.41-4.28)	UTR-2	4	12	0.916	1.07 (0.27-3.66)
UTR-3	1	10	0.110	0.18 (0.01-1.02)	UTR-3	0	11	0.056	-
UTR-4	1	4	0.558	0.51 (0.03-3.70)	UTR-4	2	3	0.396	2.25 (0.28-14.74)
UTR-5	3	6	0.927	1.07 (0.21-4.49)	UTR-5	3	6	0.488	1.70 (0.33-7.30)
UTR-6	2	1	0.226	4.55 (0.41-100.87)	UTR-6	1	2	0.702	1.62 (0.07-17.92)
UTR-7	1	2	0.959	1.07 (0.05-11.68)	UTR-7	1	2	0.702	1.62 (0.07-17.92)
UTR-1/-4/-6	12	22	0.578	1.32 (0.50-3.52)	UTR-1/-4/-6	9	25	0.649	1.28 (0.44-3.75)
Envolvimento hematológico					Fotossensibilidade				
UTR-1	15	11	0.473	1.42 (0.55-3.77)	UTR-1	5	21	0.167	0.45 (0.13-1.33)
UTR-2	8	8	0.856	0.90 (0.29-2.77)	UTR-2	6	10	0.421	1.61 (0.48-5.11)
UTR-3	5	6	0.639	0.74 (0.19-2.68)	UTR-3	2	9	0.386	0.49 (0.07-2.12)
UTR-4	4	1	0.225	4.00 (0.56-80.37)	UTR-4	2	3	0.590	1.67 (0.21-10.79)
UTR-5	4	5	0.629	0.71 (0.16-2.91)	UTR-5	3	6	0.779	1.24 (0.24-5.21)
UTR-6	0	3	0.106	-	UTR-6	1	2	0.876	1.21 (0.05-13.35)
UTR-7	2	1	0.609	1.89 (0.17-41.78)	UTR-7	2	1	0.188	5.20 (0.47-115.60)
UTR-1/-4/-6	9	25	0.648	1.28 (0.44-3.75)	UTR-1/-4/-6	8	26	0.317	0.59 (0.21-1.62)

Fonte: O autor.

Nota: UTR-1 (DTGCCCGC); UTR-2 (ITCCCGAG); UTR-3 (DTCCCGAC); UTR-4 (DCGCCAC); UTR-5 (ITCCTGAC); UTR-6 (DTGCCAC); UTR-7 (ITCATGAC).

Legenda: OR (*Odds ratio*); IC 95% (intervalo de confiança de 95%); SNC (sistema nervoso central).

Figura 9 – Concentração plasmática de HLA-G solúvel nos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância, com e sem envolvimento de manifestações clínicas



Fonte: O autor.

Legenda: sHLA-G (HLA-G solúvel); SNC (sistema nervoso central), Hemato (envolvimento hematológico)

6 DISCUSSÃO

Para melhor entendimento da Discussão, optamos por dividi-la em duas partes: na primeira parte abordamos os diferentes perfis de citocinas, assim como polimorfismos do *TNF* e *IL-10*, e na segunda parte discutimos os polimorfismos e expressão do HLA-G.

6.1 Perfil de citocinas e polimorfismos do *TNF* e *IL-10*

LES é o protótipo das doenças autoimunes com participação tanto da imunidade inata quanto da adaptativa na sua patogênese. Além da produção de autoanticorpos e deposição de imunocomplexos, outros mecanismos imunológicos já bem conhecidos envolvidos no dano tecidual; como ativação de células dendríticas, fagocitose defeituosa, consumo de complemento e anormalidades nos linfócito B e T também estão presentes (GATTO et al., 2013; RAHMAN; ISENBERG, 2008; TSOKOS, 2011).

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular produzidas principalmente por células do sistema imune e apresentam papel fundamental na regulação da resposta imune devido a sua ação na diferenciação, maturação e ativação de várias células imunes efectoras (RAPHAEL et al., 2015). Sendo assim, o descontrole na produção e ação de citocinas no LES também é importante mecanismo imunológico relacionado ao dano tecidual na doença. Vários estudos em pacientes com LES e modelos animais da doença, ambos *in vivo* e *in vitro*, demonstraram aumento na concentração de várias citocinas (CLARK et al., 2013; JACOB; STOHL, 2011; SU et al., 2012; YAP; LAI, 2013). A maioria desses estudos foram realizados em LESa (ABDEL GALIL; EZZELDIN; EL-BOSHY, 2015; ARORA et al., 2012; CHUN et al., 2007; GÓMEZ et al., 2004; TALAAT et al., 2015; UMARE et al., 2014) sendo incipientes os estudos em LESi (BALLANTINE et al., 2014; PELIÇARI et al., 2015; POSTAL et al., 2013; RANA et al., 2012).

No presente estudo, observamos aumento significativo da *IL-10* e *IL-6* em pacientes com LESi quando comparados com grupo controle saudável, assim como nos pacientes com doença ativa quando comparados com os pacientes com doença inativa. Essa associação entre *IL-10* e *IL-6* com atividade da doença foi posteriormente confirmada numa coorte de seguimento longitudinal. Nesta mesma

coorte, também foi demonstrado aumento significativo da IL-17A nos pacientes com doença ativa quando comparados com os pacientes com doença inativa; achado este não encontrado no estudo transversal. E por fim, análise multivariada usando modelo de regressão linear demonstrou IL-10 e IL-6 como fatores independentes que estão associados com aumento no escore de SLEDAI-2K.

A IL-10 é a citocina anti-inflamatória mais importante (inibe macrófagos, células dendríticas e liberação de mediadores pró-inflamatórios, e estimula a liberação de mediadores anti-inflamatórios) (SABAT et al., 2010). Paradoxalmente, pacientes com LES apresentam aumento da IL-10, ao contrário de outras doenças autoimunes como psoríase e artrite reumatoide, nas quais a IL-10 encontra-se diminuída (LLORENTE; RICHAUD-PATIN, 2003). O seu papel na patogênese do LES deve-se a sua potente ação na amplificação da resposta imune humoral. A IL-10 aumenta a proliferação e diferenciação dos linfócitos B com posterior indução na produção de autoanticorpos por estas células. O próprio linfócito B junto com os monócitos são as principais células produtoras de IL-10 no LES (LLORENTE; RICHAUD-PATIN, 2003).

A IL-10 vem sendo estudada tanto em modelos animais quanto em pacientes com LES. Administração contínua de anticorpos anti-IL10 em camundongos NZB/W F1 retardou o início de autoimunidade (desenvolvimento de glomerulonefrite e produção de autoanticorpos) (ISHIDA et al., 1994), enquanto que em camundongos SCID houve redução significativa de dano renal (RAVIRAJAN et al., 2004). Em humanos, a maioria dos estudos realizados em LESa encontraram níveis aumentados de IL-10 (PENG et al., 2013). Alguns estudos demonstraram associação da IL-10 com atividade da doença e outros com maior produção de anti-dsDNA (PENG et al., 2013). Em uma pequena série com 6 pacientes que receberam anticorpo monoclonal anti-IL-10, houve melhora no quadro cutâneo, articular e no SLEDAI (LLORENTE et al., 2000). Esses resultados, embora preliminares, sugerem um possível papel terapêutico no bloqueio da IL-10 em pacientes com LES.

Em crianças e adolescentes, são poucos os estudos que demonstraram participação da IL-10 na patogênese do LESi. Rianthavorn et al. (2013) numa população tailandesa, além de ter encontrado maior nível sérico de IL-10 nos pacientes com LESi, encontrou associação com atividade da doença; e Postal et al. (2013) numa população do sul do Brasil, também encontrou aumento de IL-10 e associação com anti-dsDNA. No nosso estudo, realizado numa população do

nordeste do Brasil, encontramos maior concentração de IL-10 nos pacientes e associação com atividade da doença tanto no estudo transversal quanto na coorte longitudinal e também na análise multivariada.

Em relação aos sítios polimórficos analisados na região promotora do *IL-10*, não foi observado diferença significativa nas frequências alélicas e genotípicas entre pacientes e grupo controle. Em LESa os resultados são divergentes, dependendo da população estudada (LÓPEZ; GUTIÉRREZ; SUÁREZ, 2010). Recente meta-análise evidenciou sólida associação do alelo -1082 G e susceptibilidade ao LESa em caucasianos. Já em asiáticos esta associação não foi demonstrada (LIU et al., 2013)

Em LESi, apenas dois estudos prévios ao nosso foram realizados. O primeiro, realizado numa população tailandesa não mostrou associação com o polimorfismo -1082 G>A e sim com o genótipo -819 CC (RIANTHAVORN et al., 2013). Outro estudo realizado numa população iraniana com LESi, não foi observado nenhuma associação com SNPs da região promotora do *IL-10*, assim como foi observado no nosso estudo (REZAEI et al., 2015)

Recentemente, estudo réplica realizado em LESa na mesma região geográfica do nosso estudo, encontrou associação com o genótipo -1082 G/A. Neste estudo, a frequência relativa do polimorfismo -1082 G/A em pacientes adultos foi de 90% contra 45% encontrado em crianças e adolescentes do nosso estudo (da SILVA et al., 2014). Essa diferença de resultados em termos de associação com LES numa mesma população nos dá noção do pequeno efeito do gene *IL-10* na susceptibilidade ao LES. Atualmente, estudos funcionais não suportam totalmente a hipótese de que o polimorfismo -1082 G/A apresenta efeito na produção da IL-10, sendo assim influenciando na susceptibilidade a determinada doença (REES et al., 2002). O polimorfismo -1082 G/A na região promotora do *IL-10* pode ser marcador de susceptibilidade a determinada doença devido ao desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos.

A IL-6 é uma clássica citocina pró-inflamatória produzida por uma variedade de células. Possui diversas ações biológicas, no entanto de grande importância para o LES está a maturação dos linfócitos B no seu estágio final os quais se diferenciam em plasmócitos e conseqüentemente aumenta a produção de imunoglobulinas (TACKEY; LIPSKY; ILLEI, 2004). O papel da IL-6 na patogênese do LES tem sido demonstrado em modelos animais e em humanos. Administração exógena de IL-6 humana recombinante em camundongos NZB/W acelerou desenvolvimento de

glomerulonefrite e aumento na mortalidade (RYFFEL et al., 1994). Da mesma forma que bloqueio crônico da IL-6 preveniu desenvolvimento de proteinúria e melhorou mortalidade desses animais (MIHARA et al., 1998). Estudos em adultos com LES já demonstraram aumento da IL-6 e associação com atividade da doença e anti-dsDNA (ABDEL GALIL; EZZELDIN; EL-BOSHY, 2015; TALAAT et al., 2015). Além do efeito sistêmico, a IL-6 também apresenta ação local com associação com algumas manifestações clínicas da doença como nefrite (IWANO et al., 1993), artrite (BALL et al., 2014) e envolvimento neuropsiquiátrico (HIROHATA et al., 2009).

No nosso estudo, além de está aumentada nos pacientes com LESi, a IL-6 estava aumentada nos pacientes com atividade da doença (tanto no estudo transversal quanto no estudo longitudinal) e apresentou associação com SLEDAI-2K. Em crianças e adolescentes com LES, apenas um estudo já havia sido descrito no qual encontrou aumento da IL-6 nos pacientes e não foi observado associação com atividade da doença (BALLANTINE et al., 2014).

Não apenas no LES a IL-17A exerce papel importante na sua patogênese, mas também em várias outras doenças autoimunes tais como psoríase, artrite reumatoide, espondiloartrite e esclerose múltipla (RAPHAEL et al., 2015). Potente citocina pró-inflamatória, a IL-17A tem ação na resposta imune contra bactérias e fungos. As principais células que a produzem são linfócitos Th17 e CD3⁺CD4⁺CD8⁻ duplo negativo (DN) célula T. No LES a IL-17A promove inflamação atuando tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Acarreta dano tecidual através do recrutamento de neutrófilos e macrófagos e facilita a infiltração de células T. Além disso, estimula a proliferação de linfócitos B, produção de autoanticorpos e principalmente inibe a diferenciação das células Treg (RAPHAEL et al., 2015).

Em pacientes adultos com LES já foi demonstrado aumento da IL-17A e expansão das células Th17 em sangue periférico (CRISPÍN et al., 2008; WONG et al., 2008). Em alguns estudos, tanto a IL-17A quanto as células Th17 apresentaram associação positiva com SLEDAI (WONG et al., 2008). Recentemente as células Th17 e DN célula T foram encontradas em biópsia renal de pacientes com nefrite lúpica (CRISPÍN et al., 2008). Em crianças com LES os resultados também são semelhantes. Estudos já demonstraram aumento da IL-17A e sua correlação com SLEDAI (PELIÇARI et al., 2015), além do predomínio das células Th17 e sua associação com nefrite lúpica (EDELBAUER et al., 2012). Embora no nosso estudo não encontramos diferença na IL-17A entre pacientes com LESi e grupo controle, no

seguimento longitudinal dos pacientes em dois momentos distintos (doença ativa *versus* doença inativa ou vice-versa) houve aumento significativo da IL-17A durante atividade da doença, o que corrobora com os estudos previamente realizados. Apesar de o estudo de seguimento longitudinal ter sido realizado com número reduzido de pacientes, o desenho do estudo permite demonstrar com mais força a associação da IL-17A com atividade da doença do que num estudo transversal, além de usar o paciente como seu próprio controle.

A relação entre TNF e LES permanece controversa (JACOB; STOHL, 2011). Em modelos animais, dependendo da cepa de camundongo analisada, os resultados são divergentes. No camundongo NZB/W com deficiência na produção de TNF, os mesmos desenvolveram manifestação grave da doença, como nefrite. No entanto, a mesma cepa competente a produção do TNF, apresentou discreta atividade da doença (KONTOYIANNIS; KOLLIAS, 2000). Já no camundongo MRL/lpr, TNF apresentou alta concentração no soro e no tecido renal, além de correlação com gravidade da nefrite (YOKOYAMA; KREFT; KELLEY, 1995). Em humanos, a maioria dos estudos publicados em LESa demonstraram maior concentração do TNF (ARORA et al., 2012; UMARE et al., 2014) e em alguns deles associação do TNF com atividade da doença (ZHU et al., 2010). No entanto, um estudo demonstrou que TNF estava aumentado nos pacientes com doença inativa quando comparado com pacientes com doença ativa e grupo controle, sugerindo papel protetor do TNF no LES (GÓMEZ et al., 2004). TNF também apresentou expressão gênica aumentada em biópsia renal de pacientes com nefrite lúpica (ARINGER; SMOLEN, 2005), e recentemente foi demonstrada sua associação com sintomas depressivos (POSTAL et al., 2016).

Estudos envolvendo TNF em crianças e adolescentes com LES são escassos. Postal et al. (2013) demonstraram nível sérico aumentado e associação com atividade da doença. No entanto, dois outros estudos não estabeleceram aumento do TNF e nem associação com atividade da doença. Interessante, no estudo realizado por Rana et al. (2012) foi observado maior expressão gênica do TNF em células mononucleares de sangue periférico, mas sem correspondência com aumento do nível sérico nos pacientes em comparação com grupo controle. No nosso estudo, não observamos diferença no nível do TNF entre pacientes com LESi e grupo controle saudável, assim como associação com atividade da doença mensurada pelo SLEDAI-2K. Essas divergências entre os estudos podem ser

justificadas pela meia-vida curta e instabilidade *ex vivo* do TNF e principalmente, no nosso estudo pelo uso da hidroxicloroquina em todos os pacientes, a qual inibe a produção do TNF (LÓPEZ et al., 2006).

Em relação aos cinco sítios polimórficos analisados na região promotora do *TNF*, também não foram observados diferença significativa nas frequências alélicas e genótípicas entre pacientes e grupo controle. Dentre esses polimorfismos, os mais estudados são -308 G>A e -238 G>A. Vários estudos em LESa analisando o polimorfismo -308 G>A em diferentes populações encontraram resultados contraditórios. O alelo -308 A apresentou associação significativa com LES em populações de mexicanos (JIMÉNEZ-MORALES et al., 2009), colombianos (GUARNIZO-ZUCCARDI et al., 2007), asiáticos (LIN et al., 2009) e espanhóis (SUÁREZ et al., 2005). Já em populações de portugueses (SANTOS et al., 2012), tailandeses (HIRANKARN; AVIHINGSANON; WONGPIYABOVORN, 2007), argentinos (MUÑOZ et al., 2014) e mexicanos (ZÚÑIGA et al., 2001) não foi observado nenhuma associação entre esse SNP e LESa. A fim de melhor esclarecer esses resultados, dois estudos de meta-análises foram realizados (LEE; HARLEY; NATH, 2006; PAN et al., 2012) Ambos demonstraram associação entre alelo -308 A e susceptibilidade para LESa, embora com pequeno tamanho do efeito. No entanto, após estratificação por etnia, associação com alelo -308 A permaneceu apenas em população de origem europeia e não mais em asiáticos e africanos. Referente ao alelo -238 G>A, resultados conflitantes também foram encontrados em diferentes populações e uma meta-análise demonstrou apenas associação com o genótipo AA (ZOU et al., 2010).

No nosso estudo, a frequência do alelo -308 A em LESi (14,7%) foi maior do que no grupo controle (8,4%), embora não tenha alcançado significado estatístico. No entanto, essa frequência foi maior quando comparamos com população iraniana (8,7%) (TAHGHIGHI et al., 2015) e mexicana (6,7%) (JIMÉNEZ-MORALES et al., 2009) em pacientes com LESi. Recentemente, estudo réplica realizado em LESa na mesma região geográfica do nosso estudo, encontrou maior frequência do alelo -308 A (26,5%) e com significado estatístico quando comparado com grupo controle (ANGELO et al., 2012). Essa diferença de resultados em termos de associação com LES nos dá uma noção do pequeno efeito deste gene na predisposição do complexo fenótipo representado pelo LES. Embora o alelo -308 A tenha sido associado a maior produção do TNF em estudos prévios, recente meta-análise não confirmou

esta associação (MEKINIAN et al., 2011). No nosso estudo, não foi observado nenhuma associação entre este alelo e concentração plasmática do TNF.

Referente aos outros polimorfismos, encontramos ausência do genótipo -1031 CC nos pacientes, o que diverge de estudo prévio realizado numa população do Egito com LESi (FARID et al., 2011) Comparando associação dos SNPs com presença ou ausência dos fenótipos clínicos, encontramos associação do alelo -863 A com serosite. Nesse mesmo estudo do Egito, o alelo -863 A apresentou associação com nefrite (FARID et al., 2011). Já no estudo brasileiro com LESa, o alelo -308 A apresentou associação com serosite (ANGELO et al., 2012). Esses resultados controversos devem-se a diversidade genética do LES nas diferentes populações.

6.2 Polimorfismos e expressão do HLA-G

Considerando as ações inibitórias do HLA-G em diversas células do sistema imune (DONADI et al., 2011) e desde a sua descoberta na interface materno-fetal durante a gravidez (KOVATS et al., 1990), o HLA-G vem sendo extensivamente estudado e com significado patológico em várias doenças como tumores sólidos e hematológicos, transplantes, infecções virais, doenças inflamatórias e autoimunes (CURIGLIANO et al., 2013; GONZÁLEZ et al., 2012). Especula-se que no câncer e em infecções virais, a sua expressão esteja relacionada como mecanismo de escape frente ao sistema imune (DONADI et al., 2011). Sendo assim, em alguns tipos de câncer, o HLA-G vem sendo considerado biomarcador de prognóstico (CURIGLIANO et al., 2013). Por outro lado, em transplantes e doenças inflamatórias e autoimunes, a sua expressão apresentaria efeito desejável (DONADI et al., 2011). Nas células do epitélio intestinal em pacientes com colite ulcerativa, o HLA-G apresenta alta expressão tecidual (TORRES et al., 2004). Em amostras de tecido cerebral de pacientes com esclerose múltipla, também foi demonstrado alta expressão do HLA-G quando comparado com amostras do grupo controle (WIENDL et al., 2005). Em ambas as doenças, a presença do HLA-G sugere papel fundamental como mecanismo de controle local da ação do sistema imune. Em algumas doenças autoimunes na faixa etária pediátrica, como diabetes melito tipo 1 e artrite idiopática juvenil, polimorfismos e expressão do HLA-G também já foram

estudados (de ALBUQUERQUE et al., 2016; PRIGIONE et al., 2011; VEIT et al., 2008).

No presente estudo, analisamos os 8 polimorfismos já descritos na região 3'UTR do *HLA-G* e expressão plasmática do sHLA-G numa coorte de pacientes brasileiros portadores de LESi. Para o nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo realizado numa população pediátrica com LESi. Até então, todos os estudos previamente realizados com polimorfismos e expressão do HLA-G foram em adultos com LES (CATAMO et al., 2015; CONSIGLIO et al., 2011; LUCENA-SILVA et al., 2013; RIZZO et al., 2008; ROSADO et al., 2008; VEIT et al., 2009; WU et al., 2009). Nosso estudo revelou: (i) ausência de associação significativa nas frequências alélicas, genótípicas e haplotípicas quando comparado com grupo controle, (ii) associação do alelo 14 pb deleção e genótipo 14 pb deleção-deleção com nefrite lúpica, (iii) associação do haplótipo 14 pb deleção/+3010C/+3142G/+3187A com nefrite lúpica e serosite, e (iv) ausência de diferença na expressão plasmática do sHLA-G quando comparado com grupo controle e menor concentração plasmática do sHLA-G nos pacientes com manifestações hematológicas quando comparado com os pacientes sem manifestações hematológicas.

Encontramos na literatura atual, em língua inglesa, 6 estudos de polimorfismos da região 3'UTR do *HLA-G* em adultos (CATAMO et al., 2015; CONSIGLIO et al., 2011; LUCENA-SILVA et al., 2013; RIZZO et al., 2008; VEIT et al., 2009; WU et al., 2009). Desses, apenas 2 artigos avaliaram os 8 polimorfismos desta região (CATAMO et al., 2015; LUCENA-SILVA et al., 2013). Nas outras publicações, 3 avaliaram apenas o polimorfismo 14 pb inserção/deleção (RIZZO et al., 2008; VEIT et al., 2009; WU et al., 2009) e uma avaliou os polimorfismos 14 pb inserção/deleção e +3142 G>C (CONSIGLIO et al., 2011). No nosso estudo, nenhuma associação significativa com risco de desenvolver LESi foi encontrada com os alelos e genótipos da região 3'UTR. Considerando o polimorfismo 14 pb inserção/deleção, o mais estudado do gene, no geral a presença do alelo de inserção está associada com menor produção do HLA-G (DONADI et al., 2011). Rizzo et al. (2008) associou o alelo 14 pb inserção e o genótipo 14 pb inserção/inserção com maior susceptibilidade para o LESa, enquanto outros autores não encontraram esta associação (CATAMO et al., 2015; CONSIGLIO et al., 2011; LUCENA-SILVA et al., 2013; VEIT et al., 2009; WU et al., 2009). Posteriormente, a fim de melhor esclarecer esta associação, 3 estudos de meta-análises envolvendo o

polimorfismo 14 pb inserção/deleção e susceptibilidade ao LESa, confirmaram a associação do alelo 14 pb inserção como fator de risco para LESa, embora com pequeno tamanho do efeito (CATAMO et al., 2015; LEE; BAE; SONG, 2015; ZHANG et al., 2014). Apesar de não termos encontrado associação estatística significativa, no nosso estudo o genótipo 14 pb inserção/inserção apresentou tendência a redução nos pacientes quando comparado com grupo controle ($P = 0.060$). Outro alelo que também apresentou tendência a redução nos pacientes com LESi quando comparado com grupo controle, foi o alelo +3187 A ($P = 0.079$). Estudo prévio realizado pelo nosso grupo com LES em adultos encontrou associação significativa com os alelos +3010 C e +3142 G (LUCENA-SILVA et al., 2013). Recentemente, Catamo et al. (2015) também recrutando pacientes adultos na mesma região geográfica, encontrou associação com o alelo +3003 C. A existência de controvérsias entre associação dos SNPs na região 3'UTR do *HLA-G* com susceptibilidade ao LESa e o pequeno poder desses estudos não nos permitem definir o papel desses polimorfismos no LESa.

Depois de avaliarmos o papel dos polimorfismos da região 3'UTR do *HLA-G* na susceptibilidade ao LESi, investigamos se algum desses polimorfismos estaria associado com alguma manifestação clínica ou laboratorial da doença. Estratificamos os pacientes com LESi de acordo com presença ou ausência de determinado parâmetro clínico ou laboratorial. O alelo 14 pb deleção e o genótipo deleção/deleção apresentaram associação com nefrite lúpica. De maneira geral, o alelo 14 pb deleção está associado com maior expressão de sHLA-G (DONADI et al., 2011). Não existe estudo avaliando a expressão tecidual do HLA-G em espécime de biópsia renal em pacientes com LES, a fim de esclarecer se no tecido renal ocorreria maior produção do HLA-G para imunossuprimir a ação local do sistema imune, como especula-se que acontece na mucosa intestinal e tecido cerebral em pacientes com retocolite ulcerativa e esclerose múltipla, respectivamente.

Nenhuma diferença significativa foi encontrada na frequência dos haplótipos da região 3'UTR do *HLA-G* entre pacientes e grupo controle. No entanto, usando a mesma estratégia empregada com os alelos em relação as manifestações clínicas e laboratoriais, foi observada associação entre dose dupla dos haplótipos UTR-1, UTR-4 e UTR-6 com nefrite lúpica e serosite. Em estudo prévio conduzido pelo nosso grupo, nós detectamos associação entre o haplótipo UTR-1 e proteção para o desenvolvimento de LESa, e em relação as manifestações clínicas, o haplótipo UTR-

4 esteve associado com úlceras orais e o haplótipo UTR-3 com proteção contra o desenvolvimento de serosite (LUCENA-SILVA et al., 2013). Além disso, Catamo et al. (2015) detectou associação entre haplótipo UTR-4 e risco de desenvolvimento de LESa. Ainda não está clara associação entre alelos do *HLA-G* e gravidade do LES, no entanto desde que a presença da sequência consenso (14 pb deleção/+3010C/+3142G/+3187A) esteve associada com risco de serosite em LESi, e associação do haplótipo UTR-3 (14 pb deleção/+3010G/+3142C/+3187A) com proteção contra o desenvolvimento de LESa, é razoável especular que os sítios polimórficos +3010 e +3142 estão envolvidos com regulação pós-transcricional do gene *HLA-G* no LES.

A diversidade de resultados encontrados entre os 3 estudos (2 em adultos e o nosso em LESi), todos realizados na região Nordeste do Brasil, seja em relação a associação ou não de alelos, genótipos e haplótipos com a doença e suas manifestações clínicas, nos dá uma ideia do pequeno efeito deste gene na predisposição ao LES, conforme especulado por Catamo et al. (2015). Outra explicação seria que o *HLA-G* exerceria uma participação maior na predisposição do LES em adultos e não em crianças e adolescentes. Recentemente, alguns genes apresentaram associação com idade de início da doença (CICCACCI et al., 2014; TAYLOR et al., 2008), o que poderia ser o caso do *HLA-G*.

E finalmente, em relação a produção do sHLA-G no plasma de pacientes e grupo controle, nenhuma diferença significativa foi encontrada. Em adultos, os resultados são conflitantes. Estudo realizado por Rizzo et al. (2008) encontrou menor concentração do sHLA-G nos pacientes, enquanto outros 2 estudos encontraram o oposto, ou seja, maior concentração do sHLA-G nos pacientes (ROSADO et al., 2008; WU et al., 2009). Assim como nosso estudo, nenhum estudo de expressão do sHLA-G encontrou associação com o escore de atividade de doença SLEDAI. Após estratificação dos pacientes de acordo com a presença ou não de manifestações clínicas, encontramos menor nível plasmático de sHLA-G nos pacientes com manifestação hematológica do LESi quando comparado com os pacientes sem manifestação hematológica. Uma vez que as principais manifestações hematológicas são decorrentes de anticorpos anti-plaquetas e anti-hemáceas, e o *HLA-G* apresenta ação inibitória sobre os linfócitos B, especulamos se nos pacientes com manifestações hematológicas a menor concentração plasmática do sHLA-G estaria favorecendo a produção dos anticorpos acima

descritos e conseqüentemente exerceria papel na patogênese das manifestações hematológicas da doença.

6.3 Limitação do estudo

A principal limitação do nosso estudo foi o pequeno número de pacientes com LESi incluídos. A fim de reduzir os efeitos desta limitação, recrutamos próximo da totalidade dos pacientes com LESi dos únicos dois centros de referência em reumatologia pediátrica da nossa região (estado de Pernambuco).

Não foi possível avaliar associação entre faixa etária e os polimorfismos genéticos estudados, uma vez que os pacientes apresentaram faixa etária homogênea e também não foi observado diferenças nas manifestações clínicas entre as faixas etárias analisadas. Sendo assim, acreditamos que embora o fator hormonal esteja envolvido no modelo de patogênese da doença, no nosso estudo o mesmo não foi responsável pelos resultados encontrados.

7 CONCLUSÕES

Em relação às citocinas:

- a) IL-10 e IL-6 apresentam papel importante na patogênese do LESi, principalmente na fase ativa da doença;
- b) No estudo longitudinal, além da IL-10 e IL-6, IL-17A também apresentou associação com fase ativa da doença;
- c) Na análise multivariada, IL-10 e IL-6 foram confirmados como fatores independentes para aumento no SLEDAI-2K;
- d) Não foi observado associação entre polimorfismos na região promotora do IL-10 com susceptibilidade ao desenvolvimento de LESi nessa amostra pediátrica da população Brasileira;
- e) Não foi observado associação entre polimorfismos na região promotora do TNF com susceptibilidade ao desenvolvimento de LESi nessa casuística. Foi observado associação entre alelo -863 A e serosite;

Em relação ao HLA-G:

- f) Não foi observado associação entre polimorfismos na região 3'UTR do HLA-G com susceptibilidade ao desenvolvimento de LESi nessa amostra pediátrica da população Brasileira;
- g) Foi observado associação da sequência consenso em dose dupla (combinação dos haplótipos UTR-1, UTR-4 e UTR-6) com nefrite lúpica e serosite nos pacientes com LESi nessa amostra pediátrica da população Brasileira;
- h) Não foi observado diferença na concentração plasmática do sHLA-G entre pacientes com LESi e grupo controle. No entanto, pacientes com manifestações hematológicas apresentaram menor concentração plasmática do sHLA-G quando comparado com os pacientes sem manifestações hematológicas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL GALIL, S. M.; EZZELDIN, N.; EL-BOSHY, M. E. The role of serum IL-17 and IL-6 as biomarkers of disease activity and predictors of remission in patients with lupus nephritis. **Cytokine**, Oxford, v. 76, n. 2, p. 280-287, 2015.
- ALARCÓN-SEGOVIA, D. et al. Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v. 52, n. 4, p. 1138-1147, 2005.
- ANGELO, H. D. et al. Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism -308 G/A in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. **Hum. Immunol.**, New York, v. 73, n. 11, p. 1166-1170, 2012.
- ARORA, V. et al. Cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus: a study on northern Indian subjects. **Lupus**, Houndmills, v. 21, n. 6, p. 596-603, 2012.
- ARINGER, M.; SMOLEN, J. S. Cytokine expression in lupus kidneys. **Lupus**, Houndmills, v. 14, n. 1, p. 13-18, 2005.
- ARINGER, M.; SMOLEN, J. S. SLE - Complex cytokine effects in a complex autoimmune disease: tumor necrosis factor in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Res. Ther.**, London, v. 5, n. 4, p. 172-177, 2003.
- BALL, E. M. et al. Plasma IL-6 levels correlate with clinical and ultrasound measures of arthritis in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, Houndmills, v. 23, n. 1, p. 46-56, 2014.
- BALLANTINE, L. E. et al. The pro-inflammatory potential of T cells in juvenile-onset systemic lupus erythematosus. **Pediatr. Rheumatol. Online J.**, London, v. 12, n. 4, 2014.
- BAYLEY, J. P.; OTTENHOFF, T. H.; VERWEIJ, C. L. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? **Genes Immun.**, Houndmills, v. 5, n. 5, p. 315-329, 2004.
- BECKER, K. G. The common variants/multiple disease hypothesis of common complex genetic disorders. **Med. Hypotheses**, Edinburgh, v. 62, n. 2, p. 309-317, 2004.
- BELOT, A. et al. Protein kinase cδ deficiency causes mendelian systemic lupus erythematosus with B cell-defective apoptosis and hyperproliferation. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v. 65, n. 8, p. 2161-2171, 2013.
- BENGTSSON, A. A. et al. Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. **Lupus**, Houndmills, v. 9, n. 9, p. 664-671, 2000.
- BOTTO, M. et al. Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. **Mol. Immunol.**, Oxford, v. 46, n. 14, p. 2774-2783, 2009.

- BRUNNER, H. I. et al. Difference in disease features between childhood-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v. 58, n. 2, p. 556-562, 2008.
- BRUNNER, H. I. et al. Health-related quality of life and its relationship to patient disease course in childhood-onset systemic lupus erythematosus. **J. Rheumatol.**, Toronto, v. 36, n. 7, p. 1536-1545, 2009.
- BRUNNER, H. I.; HUGGINS, J.; KLEIN-GITELMAN, M. S. Pediatric SLE--towards a comprehensive management plan. **Nat. Rev. Rheumatol.**, London, v. 7, n. 4, p. 225-233, 2011.
- CAROSELLA, E. D. et al. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, New York, v. 111, n. 10, p. 4862-4870, 2008.
- CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends Immunol.**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 125-132, 2008.
- CAROSELLA, E. D. The tolerogenic molecule HLA-G. **Immunol. Lett.**, Amsterdam, v. 138, n. 1, p. 22-24, 2011.
- CAROSELLA, E. D.; LEMAOULT, J. HLA-G: a look back, a look forward. **Cell. Mol. Life Sci.**, Basel, v. 68, n. 3, p. 337-340, 2011.
- CASAS, L. A.; GUTIÉRREZ, A. G. Association of genetic polymorphisms of TNF- α and IL-10, regulatory cytokines of the immune response, in infectious, allergic and autoimmune diseases. **Infectio**, Bogotá, v. 12, n. 1, p. 38-53, 2008.
- CASCIOLA-ROSEN, L. A.; ANHALT, G.; ROSEN, A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. **J. Exp. Med.**, New York, v. 179, n. 4, p. 1317-1330, 1994.
- CASTELLI, E. C. et al. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. **Genes Immun.**, Basingstoke, v. 11, n. 2, p. 134-141, 2010.
- CASTRO-MARTÍNEZ, X. H. et al. Tumor necrosis factor haplotype diversity in Mestizo and native populations of Mexico. **Tissue Antigens**, Oxford, v. 83, n. 4, p. 247-259, 2014.
- CATAMO, E. et al. Comprehensive analysis of polymorphisms in the HLA-G 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, Oxford, v. 85, n. 6, p. 458-465, 2015.
- CHEEMA, G. S. et al. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v. 44, n. 6, p. 1313-1319, 2001.

CHEN, M. J. et al. Long-term outcome and short-term survival of patients with systemic lupus erythematosus after bacteraemia episodes: 6-yr follow-up. **Rheumatology**, Oxford, v. 47, n. 9, p. 1352-1357, 2008.

CHUN, H. Y. et al. Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. **J. Clin. Immunol.**, Amsterdam, v. 27, n. 5, p. 461-466, 2007.

CICCACCI, C. et al. A multilocus genetic study in a cohort of Italian SLE patients confirms the association with STAT4 gene and describes a new association with HCP5 gene. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 11, 2014.

CLARK, D. N. et al. Cytokine inhibition as a strategy for treating systemic lupus erythematosus. **Clin. Immunol.**, Orlando, v. 148, n. 3, p. 335-343, 2013.

CONNOLLY, J. J.; HAKONARSON, H. Role of cytokines in systemic lupus erythematosus: recent progress from GWAS and sequencing. **J. Biomed. Biotechnol.**, Cairo, v. 2012, 2012.

CONSIGLIO, C. R. et al. Association of the HLA-G gene +3142C>G polymorphism with systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, Oxford, v. 77, n. 6, p. 540-545, 2011.

COURTNEY, P. A. et al. Lymphocyte apoptosis in systemic lupus erythematosus: relationships with Fas expression, serum soluble Fas and disease activity. **Lupus**, Houndmills, v. 8, n. 7, p. 508-513, 1999.

CRISPÍN, J. C. et al. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 181, n. 12, p. 8761-8766, 2008.

CRISPÍN, J. C. et al. How signaling and gene transcription aberrations dictate the systemic lupus erythematosus T cell phenotype. **Trends Immunol.**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 110-115, 2008.

CRISPÍN, J. C. et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. **Trends Mol. Med.**, Oxford, v. 16, n. 2, p. 47-57, 2010.

CUI, Y.; SHENG, Y.; ZHANG, X. Genetic susceptibility to SLE: recent progress from GWAS. **J. Autoimmun.**, London, v. 41, p. 25-33, 2013.

CURIGLIANO, G. et al. Molecular pathways: human leukocyte antigen G (HLA-G). **Clin. Cancer Res.**, Denville, v. 19, n. 20, p. 5564-5571, 2013.

de ALBUQUERQUE, R. S. et al. Association of HLA-G 3' untranslated region variants with type 1 diabetes mellitus. **Hum. Immunol.**, New York, v. 77, n. 4, p. 358-364, 2016.

DEAPEN, D. et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v. 35, n. 3, p. 311-318, 1992.

DENG, Y.; TSAO, B. P. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. **Nat. Rev. Rheumatol.**, London, v. 6, n. 12, p. 683-692, 2010.

DONADI, E. A. et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cell. Mol. Life Sci.**, Basel, v. 68, n. 3, p. 369-395, 2011.

DOREAU, A. et al. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. **Nat. Immunol.**, New York, v. 10, n. 7, p. 778-785, 2009.

EDELBAUER, M. et al. Activity of childhood lupus nephritis is linked to altered T cell and cytokine homeostasis. **J. Clin. Immunol.**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 477-487, 2012.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol. Ecol. Resour.**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FANCIULLI, M. et al. FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. **Nat. Genet.**, New York, v. 39, n. 6, p. 721-723, 2007.

FARID, T. M. et al. Association of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with juvenile systemic lupus erythematosus nephritis in a cohort of Egyptian patients. **Iran. J. Kidney Dis.**, Teheran, v. 5, n. 6, p. 392-397, 2011.

FLORES-BORJA, F. et al. Decreased Lyn expression and translocation to lipid raft signaling domains in B lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v. 52, n. 12, p. 3955-3965, 2005.

FONT, J. et al. Systemic lupus erythematosus (SLE) in childhood: analysis of clinical and immunological findings in 34 patients and comparison with SLE characteristics in adults. **Ann. Rheum. Dis.**, London, v. 57, n. 8, p. 456-459, 1998.

GATEVA, V. et al. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. **Nat. Genet.**, New York, v. 41, n. 11, p. 1228-1233, 2009.

GATTO, M. et al. Emerging and critical issues in the pathogenesis of lupus. **Autoimmun. Rev.**, Amsterdam, v. 12, n. 4, p. 523-536, 2013.

GENOV, I. R.; SOLÉ, D. Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e asma: metanálise é a saída? **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 2-8, 2007.

GLADMAN, D. D. et al. The reliability of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v. 40, n. 5, p. 809-813, 1997.

GLADMAN, D. D.; IBAÑEZ, D.; UROWITZ, M. B. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. **J. Rheumatol.**, Toronto, v. 29, n. 2, p. 288-291, 2002.

GOMES, R. G. **Associação de polimorfismos nas sequências regulatórias dos genes HLA-G, IL-10 E TNF e a sua respectiva expressão gênica em lesões de mucosa em pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal.** 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

GÓMEZ, D. et al. Th1/Th2 cytokines in patients with systemic lupus erythematosus: is tumor necrosis factor alpha protective? **Semin. Arthritis Rheum.**, Philadelphia, v. 33, n. 6, p. 404-413, 2004.

GONZÁLEZ, A. et al. The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, London, v. 49, n. 3, p. 63-84, 2012.

GONZÁLEZ, B. et al. Changes in the survival of patients with systemic lupus erythematosus in childhood: 30 years experience in Chile. **Lupus**, Houndmills, v. 14, n. 11, p. 918-923, 2005.

GRAHAM, R. R. et al. Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 71, n. 3, p. 543-553, 2002.

GUARNIZO-ZUCCARDI, P. et al. Cytokine gene polymorphisms in Colombian patients with systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, Oxford, v. 70, n. 5, p. 376-382, 2007.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, Washington, v. 48, n. 2, p. 361-372, 1992.

HAGIWARA, E. et al. Disease severity in patients with systemic lupus erythematosus correlates with an increased ratio of interleukin-10:interferon-gamma-secreting cells in the peripheral blood. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v. 39, n. 3, p. 379-385, 1996.

HANLON, P. et al. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. **Arthritis Res. Ther.**, London, v. 16, n. 1, p. 1-11, 2014.

HIRAKI, L. T. et al. Ethnic differences in pediatric systemic lupus erythematosus. **J. Rheumatol.**, Toronto, v. 36, n. 11, p. 2539-2546, 2009.

HIRANKARN, N.; AVIHINGSANON, Y.; WONGPIYABOVORN, J. Genetic susceptibility to SLE is associated with TNF-alpha gene polymorphism -863, but not -308 and -238, in Thai population. **Int. J. Immunogenet.**, Oxford, v. 34, n. 6, p. 425-430, 2007.

HIROHATA, S. et al. Accuracy of cerebrospinal fluid IL-6 testing for diagnosis of lupus psychosis. A multicenter retrospective study. **Clin. Rheumatol.**, Heidelberg, v. 28, n. 11, p. 1319-1323, 2009.

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

HOUSSIAU, F. A. et al. Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. **Lupus**, Houndmills, v. 4, n. 5, p. 393-395, 1995.

HUANG, J. L. et al. Pediatric lupus in Asia. **Lupus**, Houndmills, v. 19, n. 12, p. 1414-1418, 2010.

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.**, New York, v. 40, n. 2, p. 204-210, 2008.

ISHIDA, H. et al. Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. **J. Exp. Med.**, New York, v. 179, n. 1, p. 305-310, 1994.

IWANO, M. et al. Urinary levels of IL-6 in patients with active lupus nephritis. **Clin. Nephrol.**, Munchen, v. 40, n. 1, p. 16-21, 1993.

JACOB, N.; STOHL, W. Cytokine disturbances in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Res. Ther.**, London, v. 13, n. 4, 2011.

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.**, New York, v. 100, n. 12, p. 3019-3026, 1997.

JENKS, S. A.; SANZ, I. Altered B cell receptor signaling in human systemic lupus erythematosus. **Autoimmun. Rev.**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 209-213, 2009.

JIMÉNEZ-MORALES, S. et al. Tumor necrosis factor-alpha is a common genetic risk factor for asthma, juvenile rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus in a Mexican pediatric population. **Hum. Immunol.**, New York, v. 70, n. 4, p. 251-256, 2009.

JOHANNESON, B. et al. A major susceptibility locus for systemic lupus erythematosus maps to chromosome 1q31. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 71, n. 5, p. 1060-1071, 2002.

KAHN, P. Juvenile idiopathic arthritis: an update for the clinician. **Bull. NYU. Hosp. Jt. Dis.**, Andover, v. 70, n. 3, p.152-166, 2012.

KAMMER, G. M. et al. Abnormal T cell signal transduction in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v. 46, n. 5, p. 1139-1154, 2002.

KARIMABAD, M. N. et al. Is the IL-10 promoter polymorphism at position -592 associated with immune system-related diseases? **Inflammation**, New York, v. 36, n. 1, p. 35-41, 2013.

KLEI-GITELMAN, M.; LANE, J. C. Systemic lupus erythematosus. In: PETTY, R. E. et al. *Textbook of pediatric rheumatology*. 7. ed. Philadelphia: Elsevier, 2016. p. 285-317.

KONTOYIANNIS, D.; KOLLIAS, G. Accelerated autoimmunity and lupus nephritis in NZB mice with an engineered heterozygous deficiency in tumor necrosis factor. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, v. 30, n. 7, p. 2038-2047, 2000.

KONYA, C. et al. Update on the role of Interleukin 17 in rheumatologic autoimmune diseases. **Cytokine**, Oxford, v. 75, n. 2, p. 207-215, 2015.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 27, p. 485-517, 2009.

KOVATS, S. et al. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. **Science**, Washington, DC, v. 248, n. 4952, p. 220-223, 1990.

KRISHNAN, S. et al. Differential expression and molecular associations of Syk in systemic lupus erythematosus T cells. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 181, n. 11, p. 8145-8152, 2008.

KRUSE, K. et al. Inefficient clearance of dying cells in patients with SLE: anti-dsDNA autoantibodies, MFG-E8, HMGB-1 and other players. **Apoptosis**, London, v. 15, n. 9, p. 1098-1113, 2010.

LARSEN, M. H.; HVIID, T. V. Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. **Hum. Immunol.**, New York, v. 70, n. 12, p. 1026-1034, 2009.

LEE, Y. H.; BAE, S. C.; SONG, G. G. Meta-analysis of associations between functional HLA-G polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Rheumatol. Int.**, Berlin, v. 35, n. 6, p. 953-961, 2015.

LEE, Y. H.; HARLEY, J. B.; NATH, S. K. Meta-analysis of TNF-alpha promoter -308 A/G polymorphism and SLE susceptibility. **Eur. J. Hum. Genet.**, London, v. 14, n. 3, p. 364-371, 2006.

LEE-KIRSCH, M. A. et al. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. **Nat. Genet.**, New York, v. 39, n. 9, p. 1065-1067, 2007.

LEHMANN, P. et al. Experimental reproduction of skin lesions in lupus erythematosus by UVA and UVB radiation. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, v. 22, n. 2 pt 1, p. 181-187, 1990.

LI, D. et al. Interleukin-17 in systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. **Autoimmunity**, Oxford, v. 48, n. 6, p. 353-361, 2015.

LI, Y. et al. Phosphorylated ERM is responsible for increased T cell polarization, adhesion, and migration in patients with systemic lupus erythematosus. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 178, n. 3, p. 1938-1947, 2007.

LIN, Y. J. et al. Association of TNF-alpha gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Taiwanese patients. **Lupus**, Houndmills, v. 18, n. 11, p. 974-979, 2009.

LIU, P. et al. IL-10 gene polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 7, 2013.

LLORENTE, L.; RICHAUD-PATIN, Y. The role of interleukin-10 in systemic lupus erythematosus. **J. Autoimmun.**, London, v. 20, n. 4, p. 287-289, 2003.

LLORENTE, L. et al. Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, Hoboken, v. 43, n. 8, p.1790-1800, 2000.

LÓPEZ, P. et al. Cytokine polymorphisms influence treatment outcomes in SLE patients treated with antimalarial drugs. **Arthritis Res. Ther.**, London, v. 8, n. 2, 2006.

LÓPEZ, P.; GUTIÉRREZ, C.; SUÁREZ, A. IL-10 and TNFalpha genotypes in SLE. **J. Biomed. Biotechnol.**, Cairo, v. 2010, 2010.

LUCENA-SILVA, N. et al. HLA-G 3' untranslated region polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in 2 Brazilian populations. **J. Rheumatol.**, Toronto, v. 40, n. 7, p. 1104-1113, 2013.

MARTELLI-PALOMINO, G. et al. Polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene are associated with differential hla-g soluble levels in the Brazilian and French population. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 10, 2013.

MEKINIAN, A. et al. Functional study of TNF- α promoter polymorphisms: literature review and meta-analysis. **Eur. Cytokine Netw.**, Montrouge, v. 22, n. 2, p. 88-102, 2011.

MENIER, C. et al. Recent advances on the non-classical major histocompatibility complex class I HLA-G molecule. **Tissue Antigens**, Oxford, v. 75, n. 3, p. 201-206, 2010.

MERRILL, J. T. et al. Safety profile and clinical activity of sifalimumab, a fully human anti-interferon α monoclonal antibody, in systemic lupus erythematosus: a phase I, multicentre, double-blind randomized study. **Ann. Rheum. Dis.**, London, v. 70, n. 11, p. 1905-1913, 2011.

MIHARA, M. et al. IL-6 receptor blockage inhibits the onset of autoimmune kidney disease in NZB/W F1 mice. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v. 112, n. 3, p. 397-402, 1998.

MINA, R.; BRUNNER, H. I. Pediatric lupus--are there differences in presentation, genetics, response to therapy, and damage accrual compared with adult lupus? **Rheum. Dis. Clin. North. Am.**, Pennsylvania, v. 36, n. 1, p. 53-80, 2010.

MINA, R.; BRUNNER, H. I. Update on differences between childhood-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus. **Arthritis Res. Ther.**, London, v. 15, n. 4, p. 218-226, 2013.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 19, p. 683-765, 2001.

MUNOZ, L. E. et al. IgG opsonized nuclear remnants from dead cells cause systemic inflammation in SLE. **Autoimmunity**, Basel, v. 43, n. 3, p. 232-235, 2010.

MUÑOZ, S. A. et al. 4G/5G plasminogen activator inhibitor-1 and -308 A/G tumor necrosis factor- α promoter gene polymorphisms in Argentinean lupus patients: focus on lupus nephritis. **Clin. Exp. Med.**, Milano, v. 14, n. 1, p. 83-89, 2014.

MURPHY, G.; ISENBERG, D. Effect of gender on clinical presentation in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, Oxford, v. 52, n. 12, p. 2108-2115, 2013.

NAKASHIMA, C. A. et al. Incidence and clinical-laboratory aspects of systemic lupus erythematosus in a Southern brazilian city. **Rev. Bras. Reumatol.**, Campinas, v. 51, n. 3, p. 231-239, 2011.

PALADINO, N. et al. Gender susceptibility to chronic hepatitis C virus infection associated with interleukin 10 promoter polymorphism. **J. Virol.**, Washington, v. 80, n. 18, p. 9144-9150, 2006.

PAN, H. F. et al. Association of TNF- α promoter-308 A/G polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. **Rheumatol. Int.**, Berlin, v. 32, n. 7, p. 2083-2092, 2012.

PARK, Y. B. et al. Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. **Clin. Exp. Rheumatol.**, Piza, v. 16, n. 3, p. 283-288, 1998.

PELIÇARI, KDE. O. et al. Serum interleukin-17 levels are associated with nephritis in childhood-onset systemic lupus erythematosus. **Clinics (Sao Paulo)**, São Paulo, v. 70, n. 5, p. 313-317, 2015.

PENG, H. et al. Role of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in systemic lupus erythematosus. **Clin. Rheumatol.**, Heidelberg, v. 32, n. 9, p. 1255-1266, 2013.

PENNELL, L. M.; GALLIGAN, C. L.; FISH, E. N. Sex affects immunity. **J. Autoimmun.**, London, v. 38, n. 2-3, p. 282-291, 2012.

- PERFUMO, F.; MARTINI, A. Lupus nephritis in children. **Lupus**, Houndmills, v. 14, n. 1, p. 83-88, 2005.
- PETRI, M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, London, v. 16, n. 5, p. 847-858, 2002.
- PETRI, M. et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v. 64, n. 8, p. 2677-2686, 2012.
- PINELES, D. et al. Worldwide incidence and prevalence of pediatric onset systemic lupus erythematosus. **Lupus**, Houndmills, v. 20, n. 11, p. 1187-1192, 2011.
- PONS-ESTEL, G. J. et al. Understanding the Epidemiology and Progression of Systemic Lupus Erythematosus. **Semin. Arthritis Rheum.**, New York, v. 39, p. 257-268, 2008.
- POSTAL, M.; APPENZELLER, S. The role of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Cytokine**, San Diego, v. 56, n. 3, p. 537-543, 2011.
- POSTAL, M. et al. Th1/Th2 cytokine profile in childhood-onset systemic lupus erythematosus. **Cytokine**, San Diego, v. 61, n. 3, p. 785-791, 2013.
- POSTAL, M. et al. Depressive symptoms are associated with tumor necrosis factor alpha in systemic lupus erythematosus. **J. Neuroinflammation**, London, v. 13, n. 5, 2016.
- PRIGIONE, I. et al. HLA-G and HLA-E in patients with juvenile idiopathic arthritis. **Rheumatology**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 966-972, 2011.
- RAHMAN, A.; ISENBERG, D. A. Systemic lupus erythematosus. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 358, n. 9, p. 929-939, 2008.
- RANA, A. et al. Gene expression of cytokines (TNF- α , IFN- γ), serum profiles of IL-17 and IL-23 in paediatric systemic lupus erythematosus. **Lupus**, Houndmills, v. 21, n. 10, p. 1105-1112, 2012.
- RAPHAEL, I. et al. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. **Cytokine**, Oxford, v. 74, n. 1, p. 5-17, 2015.
- RAVIRAJAN, C. T. et al. Effect of neutralizing antibodies to IL-10 and C5 on the renal damage caused by a pathogenic human anti-dsDNA antibody. **Rheumatology**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 442-447, 2004.
- REES, L. E. et al. The interleukin-10-1082 G/A polymorphism: allele frequency in different populations and functional significance. **Cell. Mol. Life Sci.**, Basel, v. 59, n. 3, p. 560-569, 2002.

REKVIG, O. P. et al. Autoantibodies in lupus: culprits or passive bystanders? **Autoimmun. Rev.**, Amsterdam, v. 11, n. 8, p. 596-603, 2012.

REZAEI, A. et al. Lack of association between interleukin-10, transforming growth factor-beta gene polymorphisms and juvenile-onset systemic lupus erythematosus. **Clin. Rheumatol.**, Heidelberg, v. 34, n. 6, p. 1059-1064, 2015.

RHODES, B.; VYSE, T. J. The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. **Rheumatology**, Oxford, v. 47, n. 11, p. 1603-1611, 2008.

RIANTHAVORN, P. et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms and expression in Thai children with juvenile systemic lupus erythematosus. **Lupus**, Houndmills, v. 22, n. 7, p. 721-726, 2013.

RIZZO, R. et al. HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, Oxford, v. 71, n. 6, p. 520-529, 2008.

ROSADO, S. et al. Expression of human leukocyte antigen-G in systemic lupus erythematosus. **Hum. Immunol.**, New York, v. 69, n. 1, p. 9-15, 2008.

ROUAS-FREISS, N. et al. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, Washington, v. 94, n. 21, p. 11520-11525, 1997.

ROUSSET, F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. **Mol. Ecol. Resour.**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 103-106, 2008.

RYFFEL, B. et al. Interleukin-6 exacerbates glomerulonephritis in (NZB x NZW)F1 mice. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 144, n. 5, p. 927-937, 1994.

SABAT, R. et al. Biology of interleukin-10. **Cytokine Growth Factor Rev.**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 331-344, 2010.

SAG, E. et al. Performance of the new SLICC classification criteria in childhood systemic lupus erythematosus: a multicentre study. **Clin. Exp. Rheumatol.**, Pisa, v. 32, n. 3, p. 440-444, 2014.

SANTOS, M. J. et al. TNF promoter -308 G>A and LTA 252 A>G polymorphisms in Portuguese patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatol. Int.**, Berlin, v. 32, n. 8, p. 2239-2244, 2012.

SCOFIELD, R. H. et al. Klinefelter's syndrome (47,XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: support for the notion of a gene-dose effect from the X chromosome. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v. 58, n. 8, p. 2511-2517, 2008.

SHAPIRA, Y.; AGMON-LEVIN, N.; SHOENFELD, Y. Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases. **Nat. Rev. Rheumatol.**, London, v. 6, n. 8, p. 468-476, 2010.

SHELLY, S.; BOAZ, M.; ORBACH, H. Prolactin and autoimmunity. **Autoimmun. Rev.**, Amsterdam, v. 11, n. 6-7, p. 465-470, 2012.

SHERER, Y. et al. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. **Semin. Arthritis. Rheum.**, New York, v. 34, n. 2, p. 501-537, 2004.

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

SILVA, C. A.; AVCIN, T.; BRUNNER, H. I. Taxonomy for systemic lupus erythematosus with onset before adulthood. **Arthritis Care. Res. (Hoboken)**, Atlanta, v. 64, n. 12, p. 1787-1793, 2012.

da SILVA, H. D. et al. Interferon gamma and Interleukin 10 polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. **Mol. Biol. Rep.**, Dordrecht, v. 41, n. 4, p. 2493-2500, 2014.

SONG, G. G. et al. Associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. **Hum. Immunol.**, New York, v. 74, n. 3, p. 364-370, 2013.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **Am. J. Hum. Genet.**, Chicago, v. 68, n. 4, p. 978-989, 2001.

SUÁREZ, A. et al. Differential effect of IL10 and TNF{alpha} genotypes on determining susceptibility to discoid and systemic lupus erythematosus. **Ann. Rheum. Dis.**, London, v. 64, n. 11, p. 1605-1610, 2005.

SU, D. L. et al. Roles of pro- and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of SLE. **J. Biomed. Biotechnol.**, Cairo, v. 2012, 2012.

TACKEY, E.; LIPSKY, P. E.; ILLEI, G. G. Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, Houndmills, v. 13, n. 5, p. 339-343, 2004.

TAHGHIGHI, F. et al. Tumor necrosis factor-alpha single nucleotide polymorphisms in juvenile systemic lupus erythematosus. **Hum. Immunol.**, New York, v. 76, n. 8, p. 533-536, 2015.

TALAAT, R. M. et al. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. **Cytokine**, Oxford, v. 72, n. 2, p. 146-153, 2015.

TANZER, M. et al. Inpatient health care utilization by children and adolescents with systemic lupus erythematosus and kidney involvement. **Arthritis Care. Res. (Hoboken)**, Atlanta, v. 65, n. 3, p. 382-390, 2013.

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

TORRES, M. I. et al. Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease. **Int. Immunol.**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 579-583, 2004.

TSOKOS, G. C. Systemic lupus erythematosus. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 365, n. 22, p. 2110-2121, 2011.

TUCKER, L. B. et al. Adolescent onset of lupus results in more aggressive disease and worse outcomes: results of a nested matched case-control study within LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA LVII). **Lupus**, Houndmills, v. 17, n. 4, p. 314-322, 2008.

TURNER, D. M. et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur. J. Immunogenet.**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 1-8, 1997.

UMARE, V. et al. Effect of proinflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , and IL-1 β) on clinical manifestations in Indian SLE patients. **Mediators Inflamm.**, Sylvania, v. 2014, 2014.

VEIT, T. D. et al. Association of the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism with juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, Oxford, v. 71, n. 5, p. 440-446, 2008.

VEIT, T. D. et al. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, Houndmills, v. 18, n. 5, p. 424-430, 2009.

VILAR, M. J. P.; RODRIGUES, J. M.; SATO, E. I. Incidência de lúpus eritematoso sistêmico em Natal, RN-Brasil. **Ver. Bras. Reumatol.**, Campinas, v. 43, n. 6, p. 347-351, 2003.

VON SCHEVEN, E.; BAKKALOGLU, A. What's new in paediatric SLE? **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, London, v. 23, n. 5, p. 699-708, 2009.

WALPORT, M. J.; DAVIES, K. A.; BOTTO, M. C1q and systemic lupus erythematosus. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 199, n. 2, p. 265-285, 1998.

WANG, H. et al. The abnormal apoptosis of T cell subsets and possible involvement of IL-10 in systemic lupus erythematosus. **Cell. Immunol.**, New York, v. 235, n. 2, p. 117-121, 2005.

WEBB, R. et al. Early disease onset is predicted by a higher genetic risk for lupus and is associated with a more severe phenotype in lupus patients. **Ann. Rheum. Dis.**, London, v. 70, n. 1, p. 151-156, 2011.

WECKERLE, C. E.; NIEWOLD, T. B. The unexplained female predominance of systemic lupus erythematosus: clues from genetic and cytokine studies. **Clin. Rev. Allergy. Immunol.**, Totowa, v. 40, n. 1, p. 42-49, 2011.

WIENDL, H. et al. Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule HLA-G in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. **Brain**, Oxford, v. 128, n. Pt 11, p. 2689-2704, 2005.

WONG, C. K. et al. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. **Clin. Immunol.**, Orlando, v. 127, n. 3, p. 385-393, 2008.

WU, F. X. et al. Lack of association between HLA-G 14-bp polymorphism and systemic lupus erythematosus in a Han Chinese population. **Lupus**, Houndmills, v. 18, n. 14, p. 1259-1266, 2009.

XING, Q. et al. Role of Treg cells and TGF- β 1 in patients with systemic lupus erythematosus: a possible relation with lupus nephritis. **Immunol. Invest.**, London, v. 41, n. 1, p. 15-27, 2012.

XUE, C. et al. Abnormal Fas/FasL and caspase-3-mediated apoptotic signaling pathways of T lymphocyte subset in patients with systemic lupus erythematosus. **Cell. Immunol.**, New York, v. 239, n. 2, p. 121-128, 2006.

YANG, W. et al. Genome-wide association study in Asian populations identifies variants in ETS1 and WDFY4 associated with systemic lupus erythematosus. **PLoS Genet.**, San Francisco, v. 6, n. 2, 2010.

YAP, D. Y.; LAI, K. N. The role of cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus - from bench to bedside. **Nephrology**, Carlton, v. 18, n. 4, p. 243-255, 2013.

YEE, C. S. et al. The use of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-2000 to define active disease and minimal clinically meaningful change based on data from a large cohort of systemic lupus erythematosus patients. **Rheumatology**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 982-988, 2011.

YOKOYAMA, H.; KREFT, B.; KELLEY, V. R. Biphasic increase in circulating and renal TNF-alpha in MRL-lpr mice with differing regulatory mechanisms. **Kidney Int.**, New York, v. 47, n. 1, p. 122-130, 1995.

YURASOV, S. et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. **J. Exp. Med.**, New York, v. 201, n. 5, p. 703-711, 2005.

ZHANG, X. et al. Meta-analysis of the relationship between 14bp insertion/deletion polymorphism of HLA-G gene and susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Hum. Immunol.**, New York, v. 75, n. 12, p. 1171-1176, 2014.

ZHOU, M. et al. Association of the interleukin-10 gene polymorphism (-1082A/G) with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. **Lupus**, Houndmills, v. 22, n. 2, p. 128-135, 2013.

ZHU, L. J. et al. Altered expression of TNF-alpha signaling pathway proteins in systemic lupus erythematosus. **J. Rheumatol.**, Toronto, v. 37, n. 8, p. 1658-1666, 2010.

ZOU, Y. F. et al. Meta-analysis of TNF-alpha promoter - 238A/G polymorphism and SLE susceptibility. **Autoimmunity**, Basel, v. 43, n. 4, p. 264-274, 2010.

ZOU, Y. F. et al. Meta-analysis of TNF- α promoter -308A/G polymorphism and SLE susceptibility in Asian populations. **Rheumatol. Int.**, Berlin, v. 31, n. 8, p. 1055-1064, 2011.

ZÚÑIGA, J. et al. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Genes Immun.**, Houndmills, v. 2, n. 7, p. 363-366, 2001.

APÊNDICE A- FICHA CLÍNICA – GRUPO CONTROLE

NOME: _____

DATA DE NASCIMENTO: ___/___/____ SEXO: M F REGISTRO: _____

COR DA PELE: branca preta morena

RESPONSÁVEL LEGAL: _____

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, etc): _____

ENDEREÇO: _____ n^o _____ APTO. _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____ CEP: _____ - _____

TELEFONES: _____

SEU FILHO POSSUI ALGUMA DOENÇA CRÔNICA?

SIM NÃO QUAL? _____

FAZ USO CONTÍNUO DE ALGUM MEDICAMENTO?

SIM NÃO QUAL? _____

SEU FILHO POSSUI ALGUMA DOENÇA AUTOIMUNE OU ALÉRGICA (**asma, diabetes tipo 1, artrite reumatoide**)

SIM NÃO QUAL? _____

PAI BIOLÓGICO POSSUI ALGUMA DOENÇA AUTOIMUNE OU ALÉRGICA?

SIM NÃO QUAL? _____

MÃE BIOLÓGICA POSSUI ALGUMA DOENÇA AUTOIMUNE OU ALÉRGICA?

SIM NÃO QUAL? _____

IRMÃO OU IRMÃ POSSUI ALGUMA DOENÇA AUTOIMUNE OU ALÉRGICA?

SIM NÃO QUAL? _____

RESPONSÁVEL: _____

APÊNDICE B- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS MENORES DE 18 ANOS

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – HC-UFPE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE
- CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **“AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO HLA-G EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO JUVENIL E ARTRITE IDIOPÁTICA JUVENIL”**
2. PESQUISADOR : **Dr André de Souza Cavalcanti** CRM-PE: 16323.
CARGO/FUNÇÃO: **Médico responsável pelo Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do HC-UFPE.**
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO
- RISCO BAIXO RISCO MAIOR

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos

O seu filho (a) está sendo convidado (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **“Avaliação do polimorfismo do HLA-G em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e artrite idiopática juvenil”**. O objetivo do estudo é avaliar a presença de diferentes tipos do gene *HLA-G* o qual está relacionado no desenvolvimento a essas duas doenças reumatológicas comuns na faixa etária pediátrica: lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) e artrite idiopática juvenil (AIJ) e comparar esses tipos do gene *HLA-G* com o encontrado em crianças saudáveis. Sendo assim, seu filho pode fazer parte ou do grupo portador de doença ou do grupo saudável. Para participar do grupo portador de doença, seu filho (a) precisa preencher os critérios do Colégio Americano de Reumatologia para lúpus eritematoso sistêmico no caso de LESJ e os critérios da Liga Internacional de Associação para Reumatologia no caso de AIJ. Para participar do grupo saudável, seu filho (a) não pode ser portador de doenças autoimunes e/ou alérgicas e não possuir parentes de primeiro grau com essas doenças. Será preenchida uma ficha com os dados da doença através de informações coletadas no prontuário e em seguida será coletado sangue para avaliação do gene do *HLA-G*, podendo raramente ocorrer dor e hematoma no local de picada da agulha. O risco na coleta dos exames é mínimo, idêntico ao risco de seus exames de sangue de rotina. Será coletado 8 ml de sangue (no máximo duas tentativas). Os benefícios relacionados ao estudo constam em saber se o seu filho (a) possui um tipo de alteração no gene *HLA-G* que predispõe ao desenvolvimento da doença LESJ ou AIJ e você será informado (a) sobre o resultado. A descoberta de que tipo de gene *HLA-G* está associado com o desenvolvimento dessas duas doenças

reumatológicas nos leva a um melhor esclarecimento dessas doenças. Em qualquer etapa do estudo, você terá contato com os profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr André de Souza Cavalcanti que pode ser encontrado no Setor de Reumatologia do HC-UFPE, Av. Professor Moraes Rego s/n CEP: 50670-901 Recife-PE, fone: 81-21263575, e-mail: asc77@uol.com.br e a pesquisadora participante Dra Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva que pode ser encontrada no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães Av. Professor Moraes Rego, s/n Recife/PE, CEP: 50.670-420, fone: 81 2101.2500 e-mail: nlucena@cpqam.fiocruz.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com 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, fone: 81-21268588, e-mail: cepccs@ufpe.br ou Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP (CEP-IMIP) situado à Rua dos Coelhoos nº 300, Boa Vista, no prédio da Diretoria de Pesquisa do IMIP, 1º andar, fone: 2122.4756, e-mail: comitedeetica@imip.org.br. É garantida liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento no Hospital das Clínicas da UFPE ou IMIP e em sua relação com o pesquisador. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Os dados serão armazenados em microcomputador pessoal do Dr André de Souza Cavalcanti onde apenas ele e a Dra Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva terão acesso durante o período da pesquisa e após 5 anos da publicação do artigo. Você terá direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dano pessoal (tais como dor e hematoma no local de picada da agulha), diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo, o participante tem direito a tratamento médico na instituição. O compromisso do pesquisador é de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Após ser esclarecido (a) sobre as informações acima, no caso de aceitar fazer parte do estudo, 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 você não será penalizado (a) de forma alguma.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG _____, abaixo assinado, responsável pela criança, autorizo a sua participação no estudo "**Avaliação do polimorfismo do HLA-G em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e artrite idiopática juvenil**", como sujeito. Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo pesquisador **Dr André de Souza Cavalcanti** sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/ tratamento.

Local e data: _____

Nome e assinatura do responsável: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar do estudo acima descrito.

Testemunhas:

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo data ____/____/____

APÊNDICE C- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS MAIORES DE 18 ANOS

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – HC-UFPE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

1. NOME:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE
- CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **“AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO *HLA-G* EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO JUVENIL E ARTRITE IDIOPÁTICA JUVENIL”**
2. PESQUISADOR : **Dr André de Souza Cavalcanti** CRM-PE: 16323.
CARGO/FUNÇÃO: **Médico responsável pelo Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do HC-UFPE.**
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
- | | |
|--|--------------------------------------|
| RISCO MÍNIMO <input checked="" type="checkbox"/> | RISCO MÉDIO <input type="checkbox"/> |
| RISCO BAIXO <input type="checkbox"/> | RISCO MAIOR <input type="checkbox"/> |
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos

O senhor(a), assim como o seu filho(a), está sendo convidado(a) para participar como voluntário(a) da pesquisa **“Avaliação do polimorfismo do *HLA-G* em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e artrite idiopática juvenil”**. O objetivo do estudo é avaliar a presença de diferentes tipos do gene *HLA-G* o qual está relacionado no desenvolvimento a essas duas doenças reumatológicas comuns na faixa etária pediátrica: lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) e artrite idiopática juvenil (AIJ) e comparar esses tipos do gene *HLA-G* com o encontrado em crianças saudáveis. O objetivo da participação do pai e/ou mãe da criança portadora de uma dessas doenças é para investigar a origem familiar da variação do gene *HLA-G*, por isso que o senhor(a) está sendo convidado para participar da pesquisa.

Basicamente, será preenchida uma ficha com os dados de identificação e saúde do voluntário(a) e em seguida será coletado sangue para avaliação do gene *HLA-G*, podendo raramente ocorrer dor e hematoma no local de picada da agulha. O risco na coleta dos exames é mínimo, idêntico ao risco de exames de sangue de rotina. Será coletado 8 ml de sangue (no máximo duas tentativas). Os benefícios relacionados ao estudo constam em saber se o senhor(a) possui a mesma alteração no gene *HLA-G* que seu filho(a) e saber se essa alteração predispõe ao desenvolvimento da doença LESJ ou AIJ e você será informado(a) sobre o resultado. A descoberta de que tipo de gene *HLA-G* está associado com o desenvolvimento dessas duas doenças reumatológicas nos leva a um melhor esclarecimento dessas doenças. Em qualquer etapa do estudo, você terá contato com os profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr André de Souza Cavalcanti que pode ser encontrado no Setor de Reumatologia do HC-UFPE, Av. Professor Moraes Rego s/n CEP: 50670-901 Recife-PE, fone: 81-21263575, e-mail: asc77@uol.com.br e a pesquisadora participante Dra Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva que pode ser encontrada no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães Av. Professor Moraes Rego, s/n Recife/PE, CEP: 50.670-420, fone: 81-2101.2500 e-mail:

nlucena@cpgam.fiocruz.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com 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, fone: 81-21268588, e-mail: cepccs@ufpe.br ou Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do IMIP (CEP-IMIP) situado à Rua dos Coelhoos nº 300, Boa Vista, no prédio da Diretoria de Pesquisa do IMIP, 1º andar, fone: 2122.4756, e-mail: comitedeetica@imip.org.br. É garantida liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento do seu filho(a) no Hospital das Clínicas da UFPE ou IMIP e em sua relação com o pesquisador. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre a sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Os dados serão armazenados em microcomputador pessoal do Dr André de Souza Cavalcanti onde apenas ele e a Dra Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva terão acesso durante o período da pesquisa e após 5 anos da publicação do artigo. Você terá direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos propostos neste estudo, o participante tem direito a tratamento médico na instituição. O compromisso do pesquisador é de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Após ser esclarecido(a) sobre as informações acima, no caso de aceitar fazer parte do estudo, 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 você não será penalizado(a) de forma alguma.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG _____, abaixo assinado, autorizo a minha participação no estudo "**Avaliação do polimorfismo do HLA-G em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e artrite idiopática juvenil**", como sujeito. Fui devidamente informado (a) e esclarecido(a) pelo pesquisador **Dr André de Souza Cavalcanti** sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de acompanhamento, assistência e tratamento do meu filho(a).

Local e data: _____

Nome e assinatura: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar do estudo acima descrito.

Testemunhas:

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

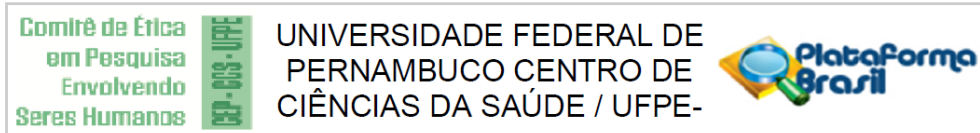
Assinatura: _____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido deste voluntário(a) para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo _____

Data ____/____/____

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HC-UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do polimorfismo do HLA-G em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e artrite idiopática juvenil

Pesquisador: André de Souza Cavalcanti

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 02400512.2.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 510.151

Data da Relatoria: 11/12/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda ao protocolo em epígrafe cujo propósito é incluir o Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) como instituição coparticipante para coleta de dados.

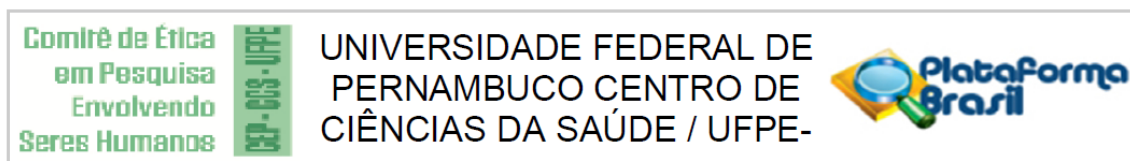
A pesquisa visa estudar o polimorfismo do gene HLA-G no lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) e na artrite idiopática juvenil (AIJ) e em seus familiares. HLA-G é uma molécula do MHC de classe I não clássica ou do grupo Ib, com múltiplas propriedades imunoregulatórias. Devido a sua ação imunossupressora, sua expressão tem sido sugerida como possível mecanismo de proteção contra resposta inflamatória autoimune.

A expressão do HLA-G em doenças inflamatórias e autoimunes é uma área relativamente recente de pesquisa. A proposta consiste basicamente em um estudo experimental com 200 pacientes: 100 portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil e 100 portadores de Artrite Idiopática Juvenil visando estabelecer uma correlação entre o gene HLA-G e suas variantes com estas patologias, a ser desenvolvida em duas fases.

Objetivo da Pesquisa:

Na Fase I a pesquisa tem por objetivo identificar os sítios polimórficos presentes no gene HLA-G e,

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 510.151

por objetivos específicos: 1) determinar as frequências alélicas e genóticas de polimorfismos do gene HLA -G em pacientes com diagnóstico de LESJ, AIJ e controles saudáveis não-relacionados e indivíduos relacionados geneticamente; 2) avaliar possível associação das frequências alélicas, genóticas e haplótipos dos sítios polimórficos do gene HLA-G encontrados com o desenvolvimento de LESJ e AIJ; 3) avaliar possível associação das frequências alélicas, genóticas e haplotípicas dos sítios polimórficos do gene HLA-G encontradas em pacientes com LESJ e correlacionar com manifestações clínicas da doença, atividade, dano cumulativo e terapia utilizada; 4) avaliar possível associação das frequências alélicas, genóticas e haplotípicas dos sítios polimórficos do gene HLA-G encontradas em pacientes com AIJ e correlacionar com subtipos de AIJ, manifestações clínicas e laboratoriais da doença e terapia utilizada e, 5) investigar a origem familiar do polimorfismo e a possível associação com casos graves.

Na Fase II, a pesquisa tem por objetivo investigar a expressão de diferentes isoformas de HLA-G na LESJ e AIJ e, por objetivos específicos: 1) determinar o nível de expressão de HLA-G em plasma de pacientes ao diagnóstico, durante a fase controlada da doença e em episódios de reativação clínica através da quantificação de mRNA, usando iniciadores específicos para amplificação de cada isoforma; 2) avaliar a expressão de isoformas de HLA-G através de técnicas imunológicas, incluindo western blot, ELISA, citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais; 3) investigar a associação de tipo e níveis de expressão de diferentes isoformas de HLA-G com quadros graves e reativação da doença; 4) determinar o perfil de resposta imune nas fases aguda e controlada da doença e relacionar com o nível e tipo de isoforma de HLA-G presente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

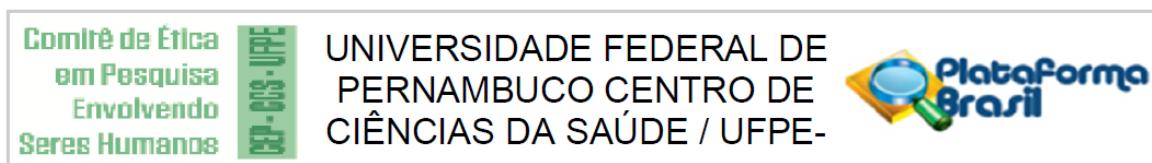
Os riscos aos quais os sujeitos de pesquisa estarão expostos estão relacionados à coleta de sangue (dor no local e pequeno hematoma).

Os benefícios relacionados ao estudo constam em saber se o paciente com LESJ ou AIJ possui um tipo de alteração no gene HLA-G que predispõe o desenvolvimento da doença. A descoberta de que tipo de gene HLAG está associado com o desenvolvimento do lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) e da artrite idiopática juvenil (AIJ), poderá contribuir para um melhor esclarecimento dessas doenças. Após o término da pesquisa será fornecido informações ao paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um tema relevante e atual sobre duas patologias reumatológicas comuns na faixa etária pediátrica, para as quais ainda não se conhece detalhadamente o papel do produto

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 510.151

codificado pelo gene HLAG, portanto, a depender dos resultados obtidos será possível melhorar o nível de conhecimento sobre a gênese destas doenças, bem como, propiciar novas estratégias de acompanhamento terapêutico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram anexados à Plataforma Brasil. Cabe ressaltar que a autorização do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) está condicionada à aprovação do projeto pelo seu Comitê (CEP - IMIP), aprovação esta que não foi anexada à Plataforma Brasil.

No que diz respeito à solicitação de inclusão do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) como mais um local de pesquisa, o pesquisador apresentou como justificativa que a referida inclusão ajudaria a alcançar o número de participantes de pesquisa estabelecido quando da definição da amostra

Recomendações:

Encaminhar, por meio de notificação, a aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada, aguardando aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados, devendo aguardar a aprovação do Comitê do IMIP.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos

CEP - CCS - UFPE

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



Continuação do Parecer: 510.151

RECIFE, 14 de Janeiro de 2014

Assinador por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CPqAM

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

PROJETO DE PESQUISA

Título: Avaliação do polimorfismo do HLA-G em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e artrite idiopática juvenil

Área Temática:

Pesquisador: André de Souza Cavalcanti

Versão: 2

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

CAAE: 02400512.2.0000.5208

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP Elaborado pela Instituição Coparticipante

Número do Parecer: 66571

Data da Relatoria: 01/08/2012

Apresentação do Projeto:

O presente trabalho tem o propósito de estudar o polimorfismo do gene HLA-G no lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ), na artrite idiopática juvenil (AIJ) e em seus familiares.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVOS Fase I ζ Identificar os sítios polimórficos presentes no gene HLA-G 3.1 Determinar as frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos do gene HLA-G em pacientes com diagnóstico de LESJ, AIJ e controles saudáveis não-relacionados e indivíduos relacionados geneticamente. 3.2 Avaliar possível associação das frequências alélicas, genotípicas e haplótipos dos sítios polimórficos do gene HLA-G encontrados com o desenvolvimento de LESJ e AIJ. 3.3 Avaliar possível associação das frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos sítios polimórficos do gene HLA-G encontradas em pacientes com LESJ e correlacionar com manifestações clínicas da doença, atividade, dano cumulativo e terapia utilizada.

- Avaliar possível associação das frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos sítios polimórficos do gene HLA-G encontradas em pacientes com AIJ e correlacionar com subtipos de AIJ, manifestações clínicas e laboratoriais da doença e terapia utilizada. 3.5

Investigar a origem familiar do polimorfismo e a possível associação com casos graves. **Fase II** ζ Investigar a expressão de diferentes isoformas de HLA-G na LESJ e AIJ

- Determinar o nível de expressão de HLA-G em plasma de pacientes ao diagnóstico, durante a fase controlada da doença e em episódios de reativação clínica através da quantificação de mRNA usando iniciadores específicos para amplificação de cada isoforma.

- Avaliar a expressão de isoformas de HLA-G através de técnicas imunológicas, incluindo western blot, ELISA, citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais.

- Investigar a associação de tipo e níveis de expressão de diferentes isoformas de HLA-G com quadros graves e reativação da doença.

- Determinar o perfil de resposta imune nas fases aguda e controlada da doença e relacionar com o nível e tipo de isoforma de HLA-G presente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco mínimo associado a coleta de sangue. Por exemplo: dor no local e pequeno hematoma.

Benefícios:

Os benefícios relacionados ao estudo constam em saber se o paciente com LESJ ou AIJ possui um tipo de alteração no gene HLA-G que predispõe o desenvolvimento da doença. A descoberta de que tipo de gene HLA-G está associado com o desenvolvimento dessas duas doenças reumatológicas nos leva a um melhor esclarecimento dessas doenças. Tema inédito na literatura. Após o término da pesquisa será fornecido informações ao paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto com grande relevância científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou todos os documentos exigidos.

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endosso a decisão de aprovação emitido pelo CEP da UFPE.

RECIFE, 03 de Agosto de 2012

Assinado por:
Janaina Campos de Miranda

ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO IMIP

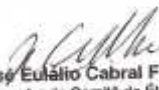
Instituto de Medicina Integral
Prof. Fernando Figueira
Escola de Pós-graduação em Saúde Materna Infantil
Instituto Clóvis Plácido



DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto de pesquisa nº 3827 - 14 intitulado "Avaliação do polimorfismo do HLA-G em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e artrite idiopática juvenil." apresentado pelo pesquisador **André de Souza Cavalcanti** foi **APROVADO** pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira – IMIP, em 13 de janeiro de 2013

Recife, 13 de janeiro de 2014


Dr. José Eulálio Cabral Filho
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa em Seres Humanos do
Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira

INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF. FERNANDO FIGUEIRA
ESCOLA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE MATERNA INFANTIL
INSTITUTO CLÓVIS PLÁCIDO
RUA DO CIELO, 100 BOA VISTA
RECIFE - PE - BRASIL - CEP: 51070-900
FONE: (51) 3225-4100
FAX: (51) 3225-4723 E-MAIL: imip@imip.org.br
WWW.IMIP.ORG.BR

Rua do Cíelão, 100 Boa Vista
Recife - PE - Brasil - CEP: 51070-900
FONE: (51) 3225-4100
FAX: (51) 3225-4723 E-MAIL: imip@imip.org.br
WWW.IMIP.ORG.BR

ANEXO D – ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (SLEDAI-2K)

MANIFESTAÇÃO	DEFINIÇÃO	PESO
CONVULSÃO	Excluir causas metabólicas, infecciosas ou drogas	8
PSICOSE	Alteração da percepção da realidade, incluindo-se alucinações, incoerências, pensamento desorganizado, catatonia. Excluir drogas e uremia.	8
SÍNDROME ORGÂNICO-CEREBRAL	Alteração mental com déficit de orientação, memória, julgamento e atenção, com dois de: fala incoerente, insônia, sonolência, hipo/hiperatividade motora. Excluir causas metabólicas, infecciosas ou drogas.	8
ALTERAÇÕES VISUAIS	Corpos cetóides ou hemorragias retinianas, exsudatos ou hemorragias de coróide, neurite óptica. Excluir causas infecciosas, drogas ou hipertensão .	8
ALTERAÇÕES DE NERVOS CRANIANOS	Neuropatia motora ou sensorial.	8
CEFALÉIA	Persistente, intensa, tipo enxaqueca, não responsiva aos analgésicos narcóticos.	8
ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL	Excluir aterosclerose.	8
VASCULITES	Úlceras, gangrena, nódulos dolorosos, infarto sub ou periungueal, biópsia ou angiografia compatível.	8
ARTRITES	Duas ou mais articulações.	4
MIOSITES	Fraqueza ou dor muscular proximal com elevação de enzimas musculares, eletromiografia ou biópsia compatíveis.	4
CILINDROS URINÁRIOS	Granulosos ou hemáticos.	4
HEMATÚRIA	Maior que 5 hemácias por campo. Excluir cálculos ou infecções.	4
PROTEINÚRIA	Maior que 0,5g/dia (em qualquer momento)	4
LEUCOCITÚRIA	Maior que 5 leucócitos por campo. Excluir infecções.	4
ERITEMA MALAR	Presente (atual ou crônico)	2
ALOPÉCIA	Perda anormal de cabelos, de forma localizada ou difusa.	2
ÚLCERAS DE MUCOSAS	Úlceras orais ou nasais.	2
PLEURITE	Dor pleurítica, com atrito ou derrame pleural, ou espessamento pleural.	2
PERICARDITE	Dor pericárdica com atrito, derrame ou eletrocardiograma ou ecocardiograma compatíveis.	2
DIMINUIÇÃO DE COMPLEMENTO	Diminuição de C3, C4 ou CH50.	2
ANTI-DNA	Presença.	2
FEBRE	Temperatura maior que 38°C. Excluir infecções.	1
PLAQUETOPENIA	Menor que 100.000/mm ³ . Excluir drogas.	1
LEUCOPENIA	Menor que 3.000/mm ³ . Excluir drogas.	1
TOTAL		

Obs: válido para manifestações de início recente (dez dias anteriores à avaliação)

ANEXO E – ARTIGO SUBMETIDO PARA BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH

 Brazilian Journal of Medical and Biological Research

[Home](#)

[Author](#)

Author Dashboard

- 1 Manuscripts with Decisions >
- 1 Manuscripts Awaiting Revision >
- Start New Submission >
- Legacy Instructions >
- 5 Most Recent E-mails >

Manuscripts with Decisions

ACTION	STATUS	ID	TITLE	SUBMITTED	DECISIONED
create a revision	ADM: Office, Journal	5738	Cytokine profile in childhood-onset systemic lupus erythematosus: a cross-sectional and longitudinal study View Submission	25-Jul-2016	27-Sep-2016
	<ul style="list-style-type: none"> • Minor Revision (27-Sep-2016) • Due on: 28-Oct-2016 				
view decision letter					

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2016. All Rights Reserved.
 ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
 ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,293,855.

[@ScholarOneNews](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#)

ANEXO F – ARTIGO SUBMETIDO PARA HLA

29/09/2016 ScholarOne Manuscript

[HLA](#)

[Home](#)

[Author](#)

Author Dashboard

- 1 Submitted Manuscripts [>](#)
- 1 Manuscripts with Decisions [>](#)
- Start New Submission [>](#)
- Legacy Instructions [>](#)
- 5 Most Recent E-mails [>](#)
- English Language Editing Service [>](#)

Manuscripts with Decisions

ACTION	STATUS	ID	TITLE	SUBMITTED	DECISIONED
a revision has been submitted (HLA-Jul-2016-0154-OA,R1)	EO: Conneely, Naomi <ul style="list-style-type: none"> Major Revision (10-Aug-2016) a revision has been submitted 	HLA-Jul-2016-0154-OA	Gene polymorphism and HLA-G expression in patients with childhood-onset systemic lupus erythematosus: a pilot study View Submission	04-Jul-2016	10-Aug-2016

[view decision letter](#)

© Thomson Reuters | © ScholarOne, Inc., 2016. All Rights Reserved.
 ScholarOne Manuscripts and ScholarOne are registered trademarks of ScholarOne, Inc.
 ScholarOne Manuscripts Patents #7,257,767 and #7,263,656.

<https://manuscriptcentral.com/HLA>

1/2

Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
EO: Conneely, Naomi <ul style="list-style-type: none"> Under Review 	HLA-Jul-2016-0154-OA,R1	Gene polymorphism and HLA-G expression in patients with childhood-onset systemic lupus erythematosus: a pilot study View Submission Cover Letter	17-Sep-2016	17-Sep-2016