

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS NFKB1, IL-10, CXCR2  
E CXCL8 NA ESCLEROSE SISTÊMICA**

**Patricia Hartstein Salim**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Tese de Doutorado

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

# **INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS NFKB1, IL-10, CXCR2 E CXCL8 NA ESCLEROSE SISTÊMICA**

**Patricia Hartstein Salim**

*Orientador:* Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre

2013

### CIP - Catalogação na Publicação

Salim, Patricia Hartstein

Influência dos polimorfismos genéticos NFKB1, IL-10, CXCR2 e CXCL8 na Esclerose Sistêmica / Patricia Hartstein Salim. -- 2013.

99 f.

Orientador: Ricardo Machado Xavier.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Genética. 2. Esclerose Sistêmica. 3. Doenças reumatológicas autoimunes. I. Xavier, Ricardo Machado, orient. II. Título.

## Agradecimentos

Ao Professor *Ricardo Machado Xavier* pela sua orientação e dedicação. Por confiar e acreditar no meu trabalho, que nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

Ao Professor *Luiz Fernando Jobim*, que acreditou em mim e possibilitou a concretização deste trabalho. Por compartilhar seu conhecimento e por todos os ensinamentos conferidos e apoio ao longo desta jornada.

Ao colega *Markus Bredemeier*, por todo o auxílio com as análises estatísticas deste trabalho.

A todos os colegas do *Serviço de Imunologia* que, de uma forma ou outra, contribuíram para que eu pudesse alcançar este objetivo.

A todos os colegas do *Serviço de Reumatologia*, pela compreensão e auxílio e ao grupo dos cientistas orientados do Prof. Ricardo M. Xavier pela amizade.

Aos meus pais, à minha avó e aos meus irmãos pelo amor, carinho e paciência em todos os momentos difíceis.

Ao meu namorado, *Rafael Hansel de Moraes*, pelo amor, amizade, companheirismo, e, principalmente, pelo apoio e compreensão dos momentos juntos dos quais tivemos que abrir mão nestes últimos tempos.

Ao FIPE-HCPA e CAPES, pelo auxílio financeiro.

***"Quando a gente acha que tem todas as respostas,  
vem a vida e muda todas a perguntas."***

(Luís Fernando Veríssimo)

## RESUMO

A esclerose sistêmica (ES) é uma doença difusa do tecido conjuntivo caracterizada por anormalidades fibróticas, imunológicas e vasculares. O fator nuclear-kB (NF-kB), como um fator de transcrição essencial envolvido na regulação de respostas imunitárias, parece ser um bom candidato para estudos sobre a patogênese de doenças autoimunes, bem como a interleucina-10 (IL-10) e as quimiocinas, CXCL8 e CXCR2. Vários estudos demonstram o envolvimento dos genes CXCR2 e IL-10 na patogênese das doenças autoimunes. Acredita-se que combinações desses genes possam ser favoráveis para o desenvolvimento da ES, podendo seu conhecimento ser benéfico para o entendimento da patogênese da ES. O objetivo deste estudo é investigar o polimorfismo dos genes IL-10, CXCR2, CXCL8 e NFKB1 em um grupo de pacientes com ES, incluindo a forma difusa e limitada da doença. Nossos resultados confirmam a associação do fenótipo de alta produção (GCC + / GCC +) com risco aumentado para ES, mas não encontrou nenhuma correlação com polimorfismos do NF-KB. Nossos achados também sugerem um papel protetor da CXCL8 (- 251) A nos genótipos TT e TC do gene CXCR2 (+1208) e um risco aumentado do CXCL8 (-251) A em associação com o genótipo CC do CXCR2 (+1208) em pacientes com ES. Nenhuma diferença estatística no polimorfismo dos genes *IL-10*, *CXCR2*, *CXCL8* e *NFKB1* foram encontradas entre a forma difusa e a forma limitada. Estes resultados indicam um potencial papel do gene IL-10 e da combinação CXCR2/CXCL8 na patogênese da ES.

**PALAVRAS-CHAVE:** CXCR2, CXCL8, Interleucina-10, NFKB1, Esclerose Sistêmica, Autoimunidade.

## **ABSTRACT**

Systemic sclerosis (SSc) is a connective tissue disease characterized by fibrotic, immunological and vascular abnormalities. Nuclear factor-kB (NF-kB), as a key transcription factor involved in the regulation of immune responses, appears to be a good candidate for studies on the pathogenesis of autoimmune diseases, as well as the interleukin-10 (IL-10) polymorphism, and CXCL8 and CXCR2 chemokines. Several studies have demonstrated the involvement of genes CXCR2 and IL-10 in the pathogenesis of autoimmune diseases. It is believed that combinations of these genes may be favorable for the development of SSc, and this knowledge can contribute to the understanding of the pathogenesis of SSc. The objective of this study is to investigate the polymorphism of IL-10, CXCR2, CXCL8 and NFKB1 in a group of patients with SSc, including diffuse and limited subtypes of the disease. Our results confirm the association of high-producing phenotype (GCC/GCC) with increased risk for SSc, but found no correlation with NFKB1 polymorphisms. Our findings also suggest a protective role of CXCL8 (-251) A in the CXCR2 (+1208) TT and TC genotypes and an increased risk of CXCL8 (-251) A in association with the CXCR2 (+1208) CC genotype in SSc patients. No statistical difference in the polymorphism of IL-10, NFKB1, CXCR2 and CXCL8 were found between the diffuse and limited SSc. These results indicate a potential role of the IL-10 gene and the combination CXCR2/CXCL8 in the pathogenesis of SSc.

**KEYWORDS:** CXCR2, CXCL8, Interleukin-10, NFKB1, Systemic Sclerosis, Autoimmunity

## ABREVIATURAS E SIGLAS

**ACA:** Anticorpo anticentrômero

**AR:** Artrite Reumatoide

**CXCR1:** *C-X-C chemokine receptor type 1* – Receptor CXC tipo 1

**CXCR2:** *C-X-C chemokine receptor type 2* – Receptor CXC tipo 2

**EA:** Espondilite Anquilosante

**ES:** Esclerose Sistêmica

**GWAS:** *Genome Wide-Associations Studies* – Estudos de associações genômicas

**HLA:** *Human Leukocyte Antigen* - Antígenos Leucocitários Humano

**IL:** *Interleukin* - Interleucina

**INF:** Interferon

**LES:** Lúpus Eritematoso Sistêmico

**NF-kB:** *Nuclear Factor kappa B* - Fator de transcrição nuclear *kappa* das células B

**NFKB1:** *NF-kappa-B p105 subunit* – NF-kB p105

**NFKB2:** *NF-kappa-B p100 subunit* – NF-kB p100

**PCR:** *Polimerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase

**RFLP:** *Restriction Fragment Length Polymorphism*

**SNP:** *Single Nucleotide Polymorphisms* - Polimorfismos de nucleotídeo único

**SS:** Síndrome de Sjodren

**SSP:** *Sequence Specific Primers* - Seqüência de Primers Específico

**TGF:** *Tumor growth factor* - Fator de crescimento tumoral

**Th :** *Linfócito T helper* – Linfócito T auxiliar

**TNF:** *Tumor Necrosis Factor* - Fator de Necrose Tumoral

**TLR:** *Toll-like Receptor* – Receptor do tipo Toll

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
2.1 ESCLEROSE SISTÊMICA.....	11
2.1.1 <i>PATOGÊNESE DA ES</i> .....	12
2.2 FUNÇÃO DAS PROTEÍNAS E DOS SEUS RESPECTIVOS GENES .....	15
2.2.1 <i>FATOR NUCLEAR DE TRANSCRIÇÃO</i> .....	15
2.2.2 <i>QUIMIOCINAS</i> .....	18
2.2.3 <i>CITOCINAS</i> .....	21
2.3 EVIDÊNCIAS DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA .....	24
2.3.1 <i>CXCL8</i> .....	24
2.3.2 <i>CXCR2</i> .....	25
2.3.3 <i>NFKB1</i> .....	26
2.3.4 <i>INTERLEUCINA 10</i> .....	27
<b>REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>34</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	34
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>4 ARTIGO ORIGINAL I.....</b>	<b>54</b>
<i>COMBINED EFFECTS OF CXCL8 AND CXCR2 GENE POLYMORPHISMS ON SYSTEMIC SCLEROSIS SUSCEPTIBILITY</i> .....	54
<b>5 ARTIGO ORIGINAL II .....</b>	<b>71</b>
<i>INTERLEUKIN-10 GENE AND NFKB1 PROMOTER INSERTION/DELETION POLYMORPHISMS IN SYSTEMIC SCLEROSIS</i> .....	71
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>91</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>92</b>
A – PROTOCOLO DE PESQUISA DE DADOS CLÍNICOS .....	92
B – PROTOCOLO DE PESQUISA DE COLETA DE DADOS .....	98
<b>ANEXOS .....</b>	<b>99</b>
ANEXO I – CRITÉRIOS ESTABELECIDOS PELO ACR PARA ESCLEROSE SISTÊMICA .....	99

## 1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho versa sobre a análise de diversos polimorfismos gênicos de potenciais mediadores imunológicos na esclerose sistêmica (ES), tais como a interleucina-10 (IL-10), o fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B) e quimiocinas (CXCR2 e CXCL8). A esclerose sistêmica é uma doença rara, caracterizada por inflamação, dano vascular, fibrose, produção de auto-anticorpos e produção excessiva de colágeno. A patogênese da doença ainda não está totalmente elucidada, mas sabe-se que está relacionada com a autoimunidade. Muitos estudos estão sendo realizados para encontrar um tratamento eficaz, que não existe atualmente. Sabe-se que fatores genéticos relacionados aos seus receptores podem estar associados a determinadas doenças.

As quimiocinas, assim como a interleucina-10 (IL-10) e o fator nuclear, são importantes reguladoras da resposta imune, incluindo a autoimunidade. O NFKB1 é um fator de transcrição que é ativado por diversos estímulos, como citocinas e produtos virais ou de bactérias. O CXCL8 é um membro da família CXC das quimiocinas que apresenta alta afinidade na ligação com o CXCR1 (receptor IL-8 tipo 1) e com o CXCR2 (receptor IL-8 tipo 2). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória potente, que desempenha um papel crucial na regulação da resposta imune e muitas vezes é essencial na prevenção de patologias inflamatórias e autoimunes.

O estudo não esgota definitivamente a matéria, mas sim, aborda de maneira clara e objetiva a definição, o conceito e a patogênese da esclerose sistêmica, bem como visa relacionar alguns estudos genéticos com a doença. Prosseguindo, apresenta a definição e o mecanismo de ação da IL-10, NF- $\kappa$ B, CXCL8 e CXCR2. Em um segundo momento, aprofunda-se nas pesquisas relacionadas destes genes com as doenças reumatológicas autoimunes, analisando de maneira breve os diferentes polimorfismos destes genes e suas associações.

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo estudar a associação dos genes CXCR2, CXCL8, IL-10 e NFKB1 com a esclerose sistêmica. Este projeto contou com o apoio financeiro do FIPE (Fundo de Investimento a Pesquisa e Eventos do HCPA) e do CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 ESCLEROSE SISTÊMICA**

A Esclerose Sistêmica (ES) é uma doença autoimune<sup>1</sup> e rara<sup>2</sup>, caracterizada pela disfunção endotelial<sup>3</sup> e fibrose<sup>4</sup>. É uma doença difusa do tecido conjuntivo, podendo afetar os órgãos e os sistemas internos do organismo. Existem duas formas de apresentação da ES, a limitada e a difusa, sendo estas diferenciadas pela extensão do envolvimento cutâneo<sup>5</sup>. As suas características principais são a excessiva deposição de colágeno<sup>6</sup>, lesões vasculares<sup>7</sup> e alterações da imunidade celular e humoral<sup>8</sup>.

Existem evidências de que certos quadros genéticos favorecem a progressão da inflamação crônica para o processo fibrótico<sup>9</sup>. A participação do sistema imune é sugerida pela presença de células mononucleares infiltradas em lesões<sup>10</sup>, anormalidades nas células T auxiliares e na função dos monócitos<sup>11</sup>, redução da atividade das células NK<sup>12</sup> e liberação de várias citocinas<sup>13</sup>.

O sistema imunológico estimula algumas células na produção de colágeno com o objetivo de formar uma cicatriz após dano tecidual<sup>14</sup>. Esta produção de colágeno é excessiva na ES e ocorre sem estímulo aparente na pele e nos órgãos internos<sup>15</sup>.

### 2.1.1 PATOGÊNESE DA ES

A etiopatogênese da ES permanece desconhecida. Sabe-se que a ativação do sistema imunológico é um fenômeno inicial na doença. Na fase inicial das lesões encontramos linfócitos T, plasmócitos, macrófagos, eosinófilos e basófilos<sup>16</sup>. Estas células ativam fibroblastos e células endoteliais através de mediadores solúveis ou pelo fenômeno de toxicidade direta. Assim, através da sua ativação por citocinas (TGF $\beta$ <sup>17</sup>, CTGF<sup>18</sup> e IL-4<sup>19</sup>), os fibroblastos produzem grandes quantidades de colágeno tipo I e III. Dentro das lesões cutâneas encontram-se grandes quantidades de linfócitos T CD4+ e CD8+, com uma alta prevalência de CD4+. Estas células são encontradas em abundância na pele na presença de células endoteliais anormais<sup>20</sup>. As células do sistema imune podem causar dano vascular através da proliferação ou estimulação de fibroblastos, para produzir colágeno<sup>21</sup>.

A ES é uma doença multifatorial complexa. Uma das hipóteses da patogênese é que a ativação do sistema imune é estimulada por predisposição genética e fatores ambientais<sup>22</sup>. Entre estes, os fatores mais conhecidos por aumentar o risco de ES incluem: a sílica cristalina<sup>23</sup>, os solventes, as resinas e os solventes aromáticos<sup>24</sup>. Alguns fatores genéticos podem influenciar a susceptibilidade para desenvolver ES<sup>25</sup>. Há casos de história familiar, no entanto, o risco absoluto para cada membro da família é baixo (<1%). O risco relativo em parentes de primeiro grau é de 10 a 16, e entre gêmeos 10 a 27<sup>26</sup>. Muitos estudos sugerem que a susceptibilidade genética sozinha não é suficiente para induzir a doença, necessitando de outros fatores envolvidos.

Vários genes foram estudados com a finalidade de encontrar um marcador polimórfico associado com a doença<sup>27</sup>. Um deles foi o sistema HLA. O gene DQA1\*0501 parece estar significativamente aumentado em homens<sup>28</sup>, enquanto outros genes do sistema HLA classe II estão associados com a presença de auto-anticorpos<sup>29,30</sup>. Associações com os genes da IL-10<sup>31</sup>, IL-13<sup>32</sup>, TNF<sup>33</sup>, TGFβ<sup>34</sup> e IL-1α<sup>35</sup> também parecem ser fatores relacionados a uma susceptibilidade genética. O TGFβ estimula a deposição da matriz extracelular pela indução de células mesenquimais para reduzir os componentes da matriz<sup>36</sup>. A matriz extracelular é regulada pela IL-10 através da inibição da proliferação dos fibroblastos, causando diminuição da produção de fibronectina e colágeno.

Estudos de associação procuram determinar variantes genéticas relacionadas a estados de doença ou traços específicos. Como mais estudos têm sido realizados em diferentes doenças complexas, tornou-se claro que a contribuição dos genes individuais ao risco genético para a doença pode ser muito modesto e que os múltiplos loci estão envolvidos no mecanismo. Neste sentido, a interpretação de estudos de associação genética em uma doença rara e fenotipicamente heterogênea, como a esclerodermia, deve ser realizada utilizando diretrizes rígidas. Tais estudos são muitas vezes limitados pela falta de poder estatístico suficiente para gerar resultados confiáveis e reprodutíveis por causa de amostras pequenas em estudos de casos e controles, heterogeneidade genética, a extensão e grau de desequilíbrio de ligação entre os marcadores genéticos que variam entre as populações<sup>37</sup>.

Estudos de genes candidatos em coortes de ascendência europeia<sup>38</sup> e japonesa<sup>39</sup> e também estudos da GWAS<sup>40</sup> tem validado a associação da ES com variantes no gene STAT4

(codificação para transdutor de sinal e ativador de transcrição de proteínas-4) que desempenha um papel chave na imunidade inata, bem como nos sistemas imunes adaptativos, em particular no desenvolvimento de células T auxiliares de tipo 1 (Th1).

Vários estudos também relataram a associação entre o genótipo HLA classe II e auto-anticorpos na ES<sup>41;42</sup>. Os haplótipos HLADRB1\*01 - DQB1\*0501 são mais comuns em pacientes com anticorpo anticentrômero (ACA)-positivo, enquanto os haplótipos HLA-DRB1\*11-DQB1\*0301 têm sido associados com anticorpo anti-topoisomerase I (anti-topo I)<sup>43</sup>.

Outros estudos também analisaram o sistema do interferon tipo I, no qual inclui os fatores regulatórios IFN 5, 7 e 8 codificados por IRF5, IRF7 e IRF8. Variantes destes genes foram associados com ES, tanto na ascendência europeia como em populações japonesas<sup>44-46</sup>. Da mesma maneira, foram associados os receptores do tipo Toll, que fazem parte dos receptores de reconhecimento-padrão que são chave para a imunidade inata. Uma variante do gene TLR2 que codifica para TLR2 (mas não as variantes em outras TLRs) tem sido associada a um risco aumentado para a forma difusa da ES, particularmente casos com antitopoisomerase-positivos<sup>47</sup>.

Nesse contexto, observou-se que o TNFAIP3- no qual codifica para o fator de necrose tumoral induzida pela proteína-3 - também foi identificado como um fator de risco na ES<sup>48</sup>, assim como o gene BLK, que tem sido referido como um fator de risco para a ES com ascendência europeia<sup>49</sup> e japonesa<sup>50</sup>. Em um estudo de meta-análise<sup>51</sup>, foi observada uma associação no subgrupo com anticorpo anticentrômero (ACA) positivo, mas não no grupo ATA-positivo. O mecanismo proposto é uma expressão do gene interrompido em células B,

especialmente através da via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Nesse sentido, também foi identificada uma associação do gene TBX21 com a ES, outro fator de transcrição essencial que regula o equilíbrio Th1 / Th2<sup>52</sup>.

Através desses estudos de susceptibilidade genética na ES podemos começar a abordar questões sobre quais as consequências funcionais dessas variantes ou o que elas resultam em uma doença clínica. Por isso a importância de cada vez mais analisarmos possíveis associações genéticas com a doença.

## ***2.2 FUNÇÃO DAS PROTEÍNAS E DOS SEUS RESPECTIVOS GENES***

### **2.2.1 FATOR NUCLEAR DE TRANSCRIÇÃO**

O fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) é um grupo de proteínas que participa na expressão de uma ampla variedade de genes que estão envolvidos na regulação de respostas imunes e inflamatórias<sup>53</sup>. Os genes que são ativados pelo NF- $\kappa$ B incluem as citocinas pró-inflamatórias, as quimiocinas e as moléculas de adesão. Alguns genes regulados pela NF- $\kappa$ B, tais como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  também ativam diretamente o NF- $\kappa$ B para amplificar e aumentar a resposta inflamatória primária. A ativação de NF- $\kappa$ B por receptores de células B ou T é também necessária para a proliferação do induzida por antígeno, a produção de citocinas, e a sobrevivência de células T e B<sup>54</sup>.

Até o momento foram identificados cinco membros da família do NF- $\kappa$ B: NFKB1 (p105/p50), NFKB2 (p100/p52), RelA (p65), RelB e c-Rel. O gene NFKB1 é localizado na região 4q23-q24 e é composto por 24 exons e introns. O gene que codifica a proteína P105 é uma molécula não-ligante do DNA citoplasmático, enquanto o gene que codifica a proteína p50 é uma proteína de ligação do DNA e corresponde ao N-terminal da p105 (Omin, 164,011)<sup>55</sup>. O gene NFKB2 é situado no braço longo do cromossomo, localizado na região 10q24, e codifica as proteínas P100 e P52 (Omin, 164,012)<sup>56</sup>. Já o gene RelA (NFKB3) é localizado na região 11q12-q13 com 10 e codifica a proteína p65 (Omin, 164,014)<sup>57</sup>; o gene RelB é situado no cromossoma 19 (OMIM, 604,758, MI-12.248) e o gene c-Rel está localizado na região 2p13-p12<sup>57</sup>.

Além disso, as funções do NFKB1 (P105) e NFKB2 (p100) são diferentes, embora as suas estruturas sejam semelhantes. Estudos têm relatado que o processamento da proteína P105 para a p50 é indispensável, sendo esse processo essencial para a organogênese de tecidos linfóides periféricos e de desenvolvimento das células B. Outra importância é que a indução do processamento da proteína p100 é regulada por um subconjunto de ligantes que ativam a NF- $\kappa$ B<sup>59</sup>. O NF- $\kappa$ B fornece um elo mecanicista determinante entre a inflamação e o tumor. Com efeito, várias citocinas inflamatórias, quimiocinas, produtos de células necróticas, bactérias e vírus estimulam a ativação do NF- $\kappa$ B. Por outro lado, as proteínas do NF- $\kappa$ B aumentam a expressão de alguns genes celulares que envolvem as citocinas, quimiocinas, o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e receptores necessários para adesão de neutrófilos e migração<sup>60</sup>.

Um estudo analisou a ativação do NF- $\kappa$ B em sinóvia de pacientes com artrite reumatoide, sugerindo um papel no controle da inflamação<sup>61</sup>. Sabe-se que a artrite reumatoide é uma doença complexa, com contribuições de autoimunidade sistêmica e inflamação local. No entanto, a ativação de NF- $\kappa$ B é significativamente diminuída em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico<sup>62</sup>. Estas observações indicam que o mecanismo de regulação do NF- $\kappa$ B é diferente entre estas doenças autoimunes.

O NF- $\kappa$ B é encontrada no citoplasma das células imunes, em associação com proteínas acessórias. O seu modo de ativação varia de acordo com o tipo de célula imune, com o seu estado de ativação ou com a sua fase de desenvolvimento<sup>63</sup>. Além disso, o NF- $\kappa$ B normalmente é impedido de entrar no núcleo de linfócitos periféricos T (células T), pois suas subunidades estão fortemente ligadas à proteína inibidora. Após a indução celular por citocinas, ocorre uma série de alterações bioquímicas, incluindo fosforilação, ubiquitinação e, em seguida, a degradação por proteossoma. Quando o NF- $\kappa$ B é capaz de translocar para o núcleo, onde se liga dentro de minutos ao DNA, inicia a expressão de genes alvo diferentes<sup>64</sup>.

A ativação e a translocação nuclear da via clássica dos dímeros NF- $\kappa$ B (principalmente p50-RelA) estão associadas com a transcrição aumentada de genes que codificam as quimiocinas, citocinas, moléculas de adesão, enzimas que produzem secundários mediadores inflamatórios e inibidores da apoptose<sup>65</sup>. Estas moléculas são componentes importantes da resposta imune inata e são necessários para a migração de células inflamatórias e fagocíticas para os tecidos onde o NF- $\kappa$ B foi ativado em resposta à infecção ou lesão. Uma extensa lista de bactérias e produtos bacterianos ativam NF- $\kappa$ B em macrófagos e outros tipos celulares. Por

exemplo, bactérias enteroinvasivas podem ativar o NF- $\kappa$ B em células epiteliais intestinais, um processo que leva à produção de mediadores inflamatórios, incluindo as quimiocinas<sup>66</sup>. Estas proteínas conduzem o recrutamento de células inflamatórias e fagocíticas para o local da infecção. Ademais, há também vias indiretas que levam à ativação do NF- $\kappa$ B, o que resulta na liberação de IL-1 e de ativação da via clássica de NF- $\kappa$ B em células adjacentes<sup>67</sup>.

### 2.2.2 QUIMIOCINAS

Quimiocinas são citocinas pró-inflamatórias quimiotáticas que recrutam leucócitos para sítios de inflamação, mas também desempenham papéis importantes no crescimento tumoral, angiogênese, cicatrização/esclerose tecidual e autoimunidade<sup>68</sup>. As quimiocinas são uma grande família de proteínas de pequeno tamanho (7-15-kD), estruturalmente relacionadas com proteínas ligantes de heparina, que podem mediar interações leucócitos-endotélio e transmigração de células. A iniciação e progressão das doenças reumatológicas envolvem múltiplas quimiocinas e células inflamatórias, tais como células T, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos e mastócitos<sup>69</sup>. As interações complexas entre células inflamatórias e quimiocinas estimulam a superprodução de síntese de proteínas da matriz extracelular por fibroblastos<sup>70;71</sup>. Portanto, as quimiocinas são de fundamental importância na patogênese dessas doenças<sup>72</sup>.

Os membros da família das quimiocinas são divididos em quatro grupos de acordo com o espaçamento dos seus primeiros dois resíduos de cisteína. CXCL8 é um membro da família CXC das quimiocinas que mostra ligação de alta afinidade para o CXCR1 (receptor IL-8 tipo 1) e CXCR2 (receptor IL-8 tipo 2). Embora o CXCR1 seja seletivamente ativado apenas pelo CXCL8, o

CXCR2 responde a várias quimiocinas adicionais. O denominador comum compartilhado por todas as quimiocinas que ativam o CXCR2 é a sequência Glu-Leu-Arg (ELR) no terminal amino, que parece servir como uma sequência de reconhecimento para ligação ao receptor e ativação<sup>73</sup>.

As primeiras investigações concentraram-se sobre o efeito do CXCL8 em neutrófilos, que respondem com a mobilização de cálcio, polimerização da actina, liberação da enzima, quimiotaxia e explosão respiratória fraca<sup>74</sup>. Apesar de afinidades semelhantes para o CXCL8 e número de receptores semelhantes da CXCR1 e CXCR2, a quimiotaxia dos neutrófilos é primeiramente mediada pelo CXCR1<sup>75;76</sup>. No entanto, apesar do CXCR2 estar associado com a forma de inibição da subunidade alfa da proteína G ( $G\alpha i2$ ) um estudo indicou que tanto o CXCR1 como o CXCR2 são acoplados a proteína G inibidora ( $G_i$ ) em neutrófilos onde  $G\alpha i2$  é muito abundante<sup>77</sup>. Portanto, foi demonstrado que o acoplamento do receptor do CXCL8 não se restringe a  $G_i$ . Pelo menos sob condições em que  $G\alpha 14$  e  $G\alpha 16$  foram superexpressos, estas proteínas G foram capazes de servir como elementos alternativos de sinal do transdutor da resposta celular mediada pelo CXCL8<sup>78</sup>.

Assim sendo, CXCL8 é ativado tanto por CXCR1 como por CXCR2 em células endoteliais. Os dois receptores usam diferentes cascatas de sinalização de transdução que resultam na ativação de proteínas G pequenas e invocam respostas que merecem ser investigadas. Estas respostas das quimiocinas mediadas por células endoteliais podem contribuir para o aumento da permeabilidade vascular e adesão de leucócitos, como observado durante a inflamação aguda, por um lado, e migração de células endoteliais e proliferação durante o processo

angiogênico, por outro lado<sup>79</sup>. A atividade do NF- $\kappa$ B pode ser necessária em etapas múltiplas durante esta cascata, quer para a indução da síntese de proteínas ou por interação direta no citoplasma<sup>80</sup>.

Com efeito, as quimiocinas e seus receptores são fatores cruciais para o dano tecidual na ES, potencialmente direcionando a migração de células pró-inflamatórias para as áreas afetadas<sup>69</sup>. Têm sido observados níveis aumentados de proteína CXCL8 em biópsia de pele<sup>81</sup> e no fluido de lavagem broncoalveolar de pacientes com ES<sup>82</sup>. Um estudo mencionou que fibroblastos da pele esclerodérmica cultivados *in vitro* produzem mais CXCL8 do que fibroblastos normais<sup>83</sup>. As concentrações séricas de CXCL8 foram significativamente maiores em pacientes com ES do que nos controles saudáveis<sup>84</sup>.

Em pacientes com alveolite fibrosante (FA) foi observado um aumento da secreção de CXCL8 por macrófagos alveolares (MA) e monócitos<sup>85</sup>. Sabe-se que na esclerodermia existe uma predisposição para o desenvolvimento de FA<sup>86</sup>, mas a secreção de CXCL8 por MA em pacientes com ES sem FA não foi maior do que em indivíduos normais e foi mais baixa do que em pacientes com alveolite fibrosante associado à ES (FASSc). Isto sugere que o aumento da secreção de CXCL8 por AM em FASSc não é constitutiva. É possível que a resposta do CXCL8 a fatores iniciais da doença pode ser diferente naqueles que irão desenvolver FA em comparação com os que não irão<sup>85</sup>.

Outro estudo mostrou que pacientes com urticária idiopática crônica (UIC) apresentam um padrão de secreção de quimiocina alterada que está potencialmente ligado a um estado inflamatório crônico. Aferindo a regulação dos genes CXCL8, avaliada por níveis de mRNA e

proteína no soro, o estudo indicou uma capacidade de resposta elevada a partir de monócitos, contribuindo para a criação de um ambiente pró-inflamatório. Estes achados sugerem que o sistema imune inato, por meio de quimiocinas e monócitos, podem levar à ativação imune<sup>87</sup>.

### **2.2.3 CITOCINAS**

As citocinas são mediadores essenciais do sistema imunitário com um amplo conjunto de funções que vão desde a regulação da inflamação até ativação celular, a proliferação ou diferenciação. As citocinas também podem promover a deposição de colágeno e de fibrose, por isso muitos estudos estão se focando sobre o papel destes como mediadores da ES, descrevendo alterações nas suas concentrações<sup>88-90</sup> ou no equilíbrio entre os níveis de citocinas Th1 e Th2<sup>91</sup>.

As citocinas incluem as interleucinas, que são proteínas (polipeptídeos) envolvidas na comunicação entre leucócitos. As atividades das interleucinas podem ser resumidas em reconhecimento de antígenos estranhos por células T, amplificação da proliferação de células T ativadas e na atração de macrófagos e identificação de mecanismos efetivos para fagocitose de microrganismos. Cada interleucina atua sobre um grupo limitado e específico de células que expressam receptores adequados para cada interleucina. A IL-10 inibe a produção da citocina Th1, suprime função dos macrófagos e ativa os linfócitos B<sup>92</sup>.

Nesse contexto, observa-se que a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória potente, que desempenha um papel crucial, muitas vezes essencial, na prevenção de patologias inflamatórias

e autoimunes<sup>93</sup>. A deficiência ou expressão anormal de IL-10 pode aumentar a resposta inflamatória ao desafio microbiano, conduzir ao desenvolvimento de doença inflamatória do intestino e uma série de distúrbios autoimunes. Assim, a expressão diminuída de IL-10 pode aumentar os agentes patogênicos durante uma infecção aguda, mas também exacerba a resposta inflamatória, que resulta em imunopatologia e danos tecidual<sup>94</sup>.

Existe uma variação muito grande na produção de IL-10 entre os indivíduos; estudos em gêmeos sugerem que até 75% da variabilidade é devido à fatores genéticos. A produção de IL-10 é controlada no nível da transcrição<sup>95</sup> e algumas variações podem ser explicadas por dois polimorfismos de microsatélites (IL10G e IL10R) na região promotora<sup>96</sup>. Onze polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) também têm sido descritos na região promotora, dos quais três estão na região proximal 1,3 kb (1082 G/A, 819 C/T, 592 C/A), e sete na região distal 1,3-4 kb. Desses, três (3575 T/A, 2849 G/A, 2763 C/A) têm frequência alélica igual<sup>97;98</sup>. Em indivíduos hígidos caucasianos o haplótipo distal AA / GA foi mais frequente naqueles que produziram menos IL-10<sup>97</sup>. Em pacientes afro-caribenhos com LES a frequência do alelo A do polimorfismo 2763 foi menor. Não há outras associações com doenças reumatológicas descritos com os SNPs na região distal. Os SNP 819 e 592 estão em desequilíbrio de ligação<sup>98</sup>. De mais a mais, apenas três haplótipos são comuns em indivíduos da raça branca: GCC, ACC e ATA; GTA é mais comum no sul da China<sup>100</sup>. O genótipo GCC / GCC é mais comum naqueles que produzem maiores níveis de IL-10, enquanto o genótipo ATA / ATA predomina em baixos produtores de IL-10<sup>97</sup>.

Os genes e os receptores das citocinas tradicionalmente têm atraído grande interesse como plausíveis fatores de risco genético para a doença autoimune. Devido à produção de

citocinas ser regulada geneticamente<sup>101;102</sup>, foi levantada a hipótese de que polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) perto de genes da citocina podem ser relevantes para o desenvolvimento de ES. No entanto, estudos realizados não conseguiram demonstrar associações significativas<sup>103;104</sup> e, em alguns casos, as associações descritas por alguns autores não foram confirmadas em outras populações independentes<sup>103-106</sup>.

Estes resultados contraditórios podem ser atribuídos a diversos fatores. Em primeiro lugar, os estudos avaliaram amostras pequenas e, portanto, sem poder de identificar uma associação real, devido ao erro tipo II<sup>107</sup>. Em segundo lugar, os SNPs estudados podem não ter um papel causal na patogênese da ES, mas sim apenas poderiam ser relevantes para a progressão ou expressão da doença<sup>103</sup>. Em terceiro lugar, cada SNP pode não ter um efeito perceptível principal independente sobre o risco de doença, mas o seu efeito pode ser dependente de outras variações genéticas (interação gene-gene)<sup>108</sup>.

O gene da IL-10 é um candidato interessante para ser estudado na patogênese da ES, não só devido às suas propriedades anti-inflamatórias, mas também porque protege contra a fibrose, pois a IL-10 reduz a produção de colágeno e fibronectina a partir de fibroblastos<sup>109</sup>. Ademais, a relevância funcional do SNP proximal na região 5' do gene da IL-10 está bem definida<sup>110</sup>.

## **2.3 EVIDÊNCIAS DE ASSOCIAÇÃO GENÉTICA**

A complexa fisiopatologia da ES implica o envolvimento de genes que afetam, individualmente ou, mais provavelmente, em conjunto a evolução do processo da doença. Muitos genes, incluindo os genes da IL-10, NFKB1, CXCR2 e CXCL8, foram associados com outras doenças autoimunes, dentre elas o lúpus eritematoso sistêmico (LES) e a artrite reumatoide (AR), o que sugere uma via comum genética para autoimunidade<sup>111</sup>.

### **2.3.1 CXCL8**

Associação de vários polimorfismos do gene CXCL8 foram estudados em relação às doenças reumatológicas (tabela 1). Em pacientes com ES foram avaliados os polimorfismos genéticos (+293 G/T), (+678 T/C) e (-353 A/T), entretanto nenhum destes polimorfismos demonstrou associação com a doença<sup>112;113</sup>. Somente foi encontrada associação quando analisada a interação gene-gene entre o polimorfismo do gene CXCL8 (-353 A/T) com o gene CCL5<sup>113</sup>. Todavia, um estudo encontrou níveis de CXCL8 aumentados em pacientes com ES<sup>119</sup>.

Em LES, um estudo evidenciou uma forte associação entre o SNP rs2227306 do gene CXCL8 e a doença.<sup>116</sup>. Porém, estudos prévios não haviam demonstrado associação com a doença, apesar de esses estudos terem um poder de estudo semelhante ao realizado por Sandling e colaboradores<sup>117;118</sup>. Esses polimorfismos não foram estudados na artrite reumatóide (AR), entretanto outros polimorfismos foram estudados e associados com essa doença. O polimorfismo (+781 C/T) do gene CXCL8 está associado com o início da doença, sendo o

homozigoto CC um fator de risco para a doença<sup>114</sup>. Já o polimorfismo (-767 A/G) não está associado com o risco de desenvolver a doença, mas o homozigoto AA está associado com o desenvolvimento da doença em idade precoce<sup>115</sup>.

**Tabela 1.** Análise do polimorfismo CXCR8 em doenças reumatológicas

Gene	Doença	Polimorfismo	Resultados	Número (N)		Estudo [Ref]
				Pacientes	Controles	
<b>CXCL8</b>						
	<i>Esclerose Sistêmica</i>					
		(+) <b>293</b> G/T	sem associação	128	194	Renzone et al. 2000 [112]
		(+) <b>678</b> T/C	sem associação	128	194	Renzone et al. 2000 [112]
		(-) <b>353</b> A/T	associação com o gene CCL5 -403 G/A (P=0,039)	99	198	Lee et al. 2007 [113]
			sem associação	128	194	Renzone et al. 2000 [112]
	<i>Artrite Reumatoide</i>					
		(+) <b>781</b> C/T	homozigoto CC (P<0,0001; rs2227306)	376	463	Emonts et al. 2011 [114]
		3'UTR 2767 A/G	homozigoto AA (P=0,02; rs10938092)	199	130	Lo et al. 2008 [115]
	<i>Lúpus Eritematoso Sistêmico</i>					
		rs4694178 C/A	alelo C (OR=1,26; P<0,001)	826	1310	Sandling et al. 2011 [116]
			sem associação	150	130	Huang et al. 2006 [117]
		(-) <b>353</b> A/T; (+) <b>781</b> C/T	sem associação	500	481	Sanchez et al. 2006 [118]

### 2.3.2 CXCR2

Até o momento, em pacientes com espondilite anquilosante (EA), não foram realizados estudos genéticos em associação do polimorfismo do gene CXCR2, mas outros estudos analisaram a presença do polimorfismo em ES, LES, SS e AR (tabela 2). Por conseguinte, um estudo avaliou a susceptibilidade do polimorfismo (-786 C/T) do gene CXCR2 em pacientes com artrite reumatoide, contudo não foi encontrada associação entre o gene e a doença. Da mesma maneira não foi encontrada associação quando avaliada a correlação deste mesmo polimorfismo em pacientes com LES e ES<sup>120</sup>. No entanto, outro estudo avaliou o polimorfismo (+1208 C/T) em pacientes britânicos, observando uma forte associação do gene homozigoto TT com o fator de risco para a doença<sup>112</sup>.

**Tabela 2.** Análise do polimorfismo CXCR2 em doenças reumatológicas

Gene	Doença	Polimorfismo	Resultados	Número (N)		Estudo [Ref]
				Pacientes	Controles	
<b>CXCR2</b>						
	<i>Esclerose Sistêmica</i>					
		(-)786 C/T	sem associação	14	242	Kato et al. 2000 [120]
			homozigoto CC (OR=1,7; P=0,04)	99	198	Lee et al. 2007 [113]
		(+)785 C/T	homozigoto CC (OR=2,33; P=0,01)	128	194	Renzone et al. 2000 [112]
		(+)1208 C/T	homozigoto TT (OR=2,67; P=0,003)	128	194	Renzone et al. 2000 [112]
		(+)1440 G/A	sem associação	128	194	Renzone et al. 2000 [112]
	<i>Artrite Reumatóide</i>					
		(-) 786 C/T	sem associação	146	242	Kato et al. 2000 [120]
	<i>Lupus Eritematoso Sistêmico</i>					
		(-) 786 C/T	sem associação	80	242	Kato et al. 2000 [120]
	<i>Síndrome de Sjögren</i>					
		(-) 786 C/T	sem associação	12	242	Kato et al. 2000 [120]

### 2.3.3 NFKB1

O polimorfismo do NFKB1 foi avaliado em várias doenças reumatológicas (tabela 3), contudo, em pacientes com ES nenhum estudo avaliou associação com a inserção/deleção dos aminoácidos ATTG na posição -94 do gene NFKB1. Na AR não foi encontrada associação diretamente do gene com a doença<sup>121-124</sup>, no entanto um estudo demonstrou que o genótipo homozigoto com a deleção do ATTG (Del/Del) no gene NFKB1 tem alto risco para eventos cardiovasculares em pacientes com AR comparado com pacientes que eram homozigotos para a inserção do gene<sup>124</sup>. Outro estudo estratificou os pacientes de acordo com o genótipo do NFKB1 e avaliou sua combinação com o polimorfismo FCRL3, observando uma susceptibilidade à doença nos pacientes que eram heterozigotos (ins/Del) para o gene NFKB1<sup>123</sup>.

Segundo um estudo, pacientes com LES tem um risco menor de desenvolver a doença quando incidir a presença do heterozigoto (inserção/deleção) do gene NFKB1 (94ins/delATTG)<sup>125</sup>. Entretanto outro estudo realizado não encontrou associação do gene NFKB1

em pacientes com LES<sup>121</sup>. Por outro lado, uma meta-análise analisou vários estudos em pacientes com doenças autoimunes de várias regiões e sugeriu uma possível associação do polimorfismo do gene promotor NFKB1 -94ins/delATTG em certas doenças autoimunes e inflamatórias em pacientes asiáticos, mas não encontrou associação com a população caucasóide<sup>127</sup>.

**Tabela 3.** Análise do polimorfismo NFKB1 -94ins/delATTG (rs28362491) em doenças reumatológicas

Gene	Doença	Resultados	Número (N)		Estudo [Ref]
			Pacientes	Controle	
<b>NFKB1 -94ins/delATTG (rs28362491)</b>					
<i>Artrite Reumatoide</i>					
	sem associação		272	264	Orozco et al. 2005 [121]
	sem associação		458	657	Dieguez-Gonzalez et al. 2009 [122]
	associação do gene heterozigoto (ins/del) com o gene FCRL3 (-169)GG (P=0,003)		592	646	Martinez et al. 2006 [123]
	associação do gene homozigoto para a deleção (del/del) com o risco para eventos cardiovasculares (OR=1,76; P=0,03)		1437	*	Lopez-Mejias et al. 2002 [124]
<i>Lúpus Eritematoso Sistêmico</i>					
	proteção com o gene heterozigoto (ins/del) (OR=0,52; P=0,012)		224	256	Gao et al. 2012 [125]
	sem associação		181	264	Orozco et al. 2005 [121]
<i>Espondilite Anquilosante</i>					
	sem associação		205	200	Kim et al. 2005 [126]

\*O estudo somente avaliou a interação entre os pacientes

### 2.3.4 INTERLEUCINA 10

Diferentes estudos associaram diversos polimorfismos da IL-10 em doenças reumatológicas. Na Síndrome de Sjogren (SS), vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene da IL-10 foram estudados com a doença em diferentes partes do mundo, como mostra a tabela 4. No entanto, nenhum destes polimorfismos foi associado individualmente com a doença. O que está associado com a SS, distintamente em cada região, são os haplótipos dos

polimorfismos -1082 G/A, -819 C/T, e -592 C/A (GCC, ACC, ATA). No Japão, a presença do haplótipo ATA e a ausência do haplótipo ACC foi associada com uma alta susceptibilidade para desenvolver a SS<sup>130</sup>. Na Alemanha o haplótipo ACC foi associado com as manifestações clínicas da doença, o haplótipo estava mais presente em pacientes com anticorpos anti-alfa Fodrin IgA<sup>128</sup>. Na Espanha o haplótipo GCC foi considerado um fator de risco para os pacientes e o haplótipo ACC foi conceituado com um fator protetor para a doença<sup>129</sup>. Um estudo realizado na Finlândia sugeriu que a presença do haplótipo GCC ou o genótipo GCC/ATA na ausência do haplótipo ACC está associado com uma elevada susceptibilidade para o desenvolvimento da doença<sup>131</sup>. Por outro lado, um estudo realizado na Hungria não encontrou associação dos haplótipos com a doença, mas demonstrou que o homocigoto GG do polimorfismo (-1082) do gene IL-10 está associado com níveis elevados de IL-10 em controles saudáveis<sup>133</sup>.

**Tabela 4.** Análise do polimorfismo da interleucina 10 (IL-10) em Síndrome de Sjögren

Gene	Doença	Polimorfismo	Resultados	Número (N)		Estudo [Ref]
				Pacientes	Controles	
<b>IL-10</b>						
<i>Síndrome de Sjögren</i>						
		(-) <b>1082</b> G/A; (-) <b>819</b> C/T; (-) <b>592</b> C/A	associação do haplótipo ACC (OR=2,86; P=0,024)	111	145	Wileke et al. 2008 [128]
			associação do genótipo GCC/ACC (OR=3,35; P=0,001)	63	150	Font et al. 2002 [129]
			proteção com o haplótipo ACC (OR=0,49; P=0,047)	47	107	Origuchi et al. 2003 [130]
			proteção com o haplótipo ACC (OR=0,44; P=0,025) e associação do haplótipo GCC (OR=1,90; P=0,046)	62	400	Hulkkonen et al. 2001 [131]
			sem associação	108	*	Rischmueller et al. 2001 [132]
		(-) <b>1082</b> G/A	associação do homocigoto GG com níveis séricos elevados de IL-10 em controles (P=0,01)	99	135	Marka et al. 2005 [133]

\*O estudo somente avaliou a interação entre os pacientes

Uma meta-análise realizada em pacientes com ES relatou que o polimorfismo -819 (C/T) da IL-10 está associado com a susceptibilidade para o desenvolvimento da ES (tabela 5). Eles observaram que o alelo C no locus -819 da IL-10 pode ser um fator de risco e o alelo A do polimorfismo 3575 pode contribuir para a doença, especialmente em caucasóides<sup>134</sup>. Contudo,

outros estudos realizados individualmente não obtiveram os mesmos resultados. No oeste da Escócia não houve diferença estatística na distribuição dos genótipos da IL-10 entre pacientes e controles, mas, interessantemente, pacientes com a forma difusa da doença apresentavam uma baixa frequência do genótipo GCC/GCC (que está associado com uma alta produção de IL-10), sugerindo que a herança dos genótipos da IL-10 pode ser um dos eventos moleculares que determinam o fenótipo clínico<sup>105</sup>. Na Itália<sup>137</sup> e na Turquia<sup>136</sup> o haplótipo GCC estava mais expresso em pacientes com ES do que em controles, no entanto outro estudo realizado na Itália não encontrou tais associações com a doença<sup>104</sup>. No Japão, outros polimorfismos foram avaliados: -3575 A/T, -2849 A/G, e -2763 A/C, sendo que a frequência do heterozigoto AC na posição 2763 foi mais alta nos pacientes com ES do que nos controles. Já em pacientes com a forma difusa da esclerodermia tinham a frequência do homozigoto CC mais baixa quando comparado com controles sadios. Em caucasoides a frequência do homozigoto AA nas posições -3575 e 2763 foi maior em pacientes com ES comparado com os controles<sup>31</sup>.

**Tabela 5.** Análise do polimorfismo da interleucina 10 (IL-10) em Esclerose Sistêmica

Gene	Doença	Polimorfismo	Resultados	Número (N)		Estudo [Ref]
				Pacientes	Controles	
<b>IL-10</b>						
<i>Esclerose Sistêmica</i>						
		(-) <b>1082G/A</b> ; (-) <b>819C/T</b> ; (-) <b>592C/A</b>	associação do haplótipo GCC com a forma difusa (OR=1,84; P=0,04) proteção do genótipo GCC/GCC com a forma difusa (OR=0,10; P=0,005) associação do genótipo GCC/GCC (OR=5,07; P=0,002)	161 51 45	94 94 150	Beretta et al. 2007 [135] Crilly et al. 2003 [105] Ates et al. 2008 [136]
		(-) <b>590 A/C</b>	sem associação	242	242	Beretta et al. 2008 [137]
		(-) <b>3575 A/T</b>	associação do haplótipo AA com a forma limitada (OR=3,60; P=0,0002) sem associação	105 78	143 692	Hudson et al. 2005 [31] Matuzzi et al. 2007 [104]
		(-) <b>2849 A/G</b>	associação do haplótipo GG com a forma limitada (OR=0,53; P=0,03)	105	143	Hudson et al. 2005 [31]
		(-) <b>2763 A/C</b>	associação do haplótipo AA com a forma limitada (OR=3,50; P=0,003) e a forma difusa (OR=3,0; P=0,03)	105	143	Hudson et al. 2005 [31]

Alguns estudos em pacientes com artrite reumatoide não encontraram associação de polimorfismos da IL-10 com a doença (tabela 6)<sup>140;142;144</sup>. No entanto, determinados estudos observaram um fator de proteção deste gene para estes pacientes. Lee e colaboradores (2012) ressaltaram que o alelo C do SNP -819 foi mais frequente nos controles do que nos pacientes com AR<sup>153</sup>. De Paz e colaboradores (2010) também encontraram um fator de proteção, mas no homocigoto AA do SNP -1082 da IL-10<sup>151</sup>, assim como Zhang e colaboradores (2011), que observaram uma proteção com o alelo G<sup>152</sup> nesse mesmo SNP.

Por outro lado, todos os outros estudos observaram um fator de susceptibilidade para a doença. Ying e colaboradores (2011) relataram uma maior frequência do alelo A do SNP -592 nos pacientes com AR<sup>156</sup>. Doutro modo Pawlik e colaboradores (2005) referiram uma maior frequência do genótipo GCC/GCC em pacientes com AR<sup>141</sup> e Padyukov et al. 2004 somente observou a susceptibilidade para mulheres com AR no SNP -1082 AA<sup>149</sup>. Ates et al. (2008) e Cantagrel et al. (1999) também mencionaram o SNP -1082 como um fator de susceptibilidade para a doença<sup>136;150</sup>.

Um estudo realizou uma meta-análise com diversos estudos, avaliando a população analisada e os diferentes SNPs. Foi relatado que o polimorfismo -592 C/A da IL-10 confere susceptibilidade para AR somente em pacientes asiáticos, e os polimorfismos -1082 G/A e -892 C/T estão associados com AR independente da população<sup>153</sup>. Conforme observamos, numerosos estudos têm determinado a associação entre o polimorfismo -1082 A / G no gene IL-10 e o risco de AR, mas os resultados não foram conclusivos. Isto é, em parte, porque um único estudo pode não ser suficiente para detectar um possível efeito deste polimorfismo em AR, especialmente

quando o tamanho da amostra é relativamente pequeno. Assim, a fim de obter uma melhor estimativa da associação, foi realizada uma meta-análise de todos os estudos que analisaram o polimorfismo -1082 A/G. Os resultados indicaram que os portadores do alelo G (GG + GA) apresentaram 25% de redução do risco de AR, quando comparado com o homozigoto AA<sup>152</sup>.

Tabela 6. Análise do polimorfismo da interleucina 10 (IL-10) em Artrite Reumatóide

Gene	Doença	Polimorfismo	Resultados	Número (N)		Estudo [Ref]
				Pacientes	Controles	
IL-10	Artrite Reumatóide	(-)1082G/A; (-)819C/T; (-)592C/A	progressão radiográfica grave associada com o haplótipo GCC (OR=2,8; P=0,003)	151	*	Ursum et al. 2010 [138]
			associação do haplótipo GCC (OR=1,46; P=0,006) e ACC (OR=1,43; P=0,011)	98	122	Ates et al. 2008 [136]
		(-)1082G/A; (-)824C/T; (-)597C/A	associação do haplótipo ACC em pacientes positivos para fator reumatóide IgA (OR=1,6; P=0,05)	234	238	Hajeer et al. 1998 [139]
			sem associação	102	102	Moreno et al. 2007 [140]
			associação do genótipo GCC/GCC (OR=2,18; P<0,005)	95	104	Pawlik et al. 2005 [141]
			sem associação	222	398	Gambhir et al. 2010 [142]
		(-)1087G/A; (-)824C/T; (-)597C/A	haplótipo ATA associado com baixa produção de IL-10 (P<0,05)	84	95	Hee et al. 2007 [147]
			sem associação	117	295	Coakley et al. 1998 [144]
		(-)2849G/A; (-)1082G/A; (-)819C/T	genótipo ATA/ATA associado com baixa produção de IL-10 (P=0,012)	84	95	Seng et al. 2007 [145]
			associação negativa do haplótipo GAT com anticorpos anti-adalimumab (P=0,004)	192	*	Bartelds et al. 2009 [146]
		(-)3575T/A; (-)2849G/A; (-)2763C/A; (-)1082G/A; (-)819C/T; (-)592C/A	associação do haplótipo TGAATA com anti-CPP negativo (OR=1,8; P=0,025)	144	*	Nemec et al. 2009 [147]
			associação do alelo G em pacientes positivos para fator reumatóide IgG (P<0,001)	283	1220	Lard et al. 2003 [148]
		(-)2849 G/A	associação do genótipo AA em mulheres (OR=2,07; P<0,01)	264	286	Padyukov et al. 2004 [149]
			sem associação (rs1800896)	376	463	Emonts et al. 2011 [114]
		(-)1087 G/A	sem associação	108	128	Cantagrel et al. 1999 [150]
			proteção com o genótipo AA (OR=0,56; P=0,006)	162	373	de Paz et al. 2010 [151]
		(-)1082 G/A	associação do genótipo GG em pacientes positivos para fator reumatóide IgA (OR=3,48; P=0,017)	144	*	Nemec et al. 2009 [69]
			proteção com o alelo G (OR=0,75; P=0,01)	1480	1413	Zhang et al. 2011 [152]
		(-)892 C/T	proteção com o alelo C (OR=0,55; P=0,003)		meta-análise	Lee et al. 2012 [153]
			sem associação (rs3021097)	376	463	Emonts et al. 2011 [114]
(-)819 C/T	sem associação	198	100	Huang et al. 2005 [154]		
	sem associação	164	196	Ying et al. 2011 [155]		
(-)627 C/A	associação do alelo A (OR=1,31; P=0,008)	244	106	Paradowska-Gorycka et al. 2009 [156]		
	associação do genótipo CA (OR=46,34; P<0,001)	244	106	Paradowska-Gorycka et al. 2009 [156]		
(-)592 C/A	associação do genótipo CC com anti-CPP negativo (P=0,002)	964	*	Marinou et al. 2007 [157]		

\*O estudo somente avaliou a interação entre os pacientes

Analisando a associação para o desenvolvimento do LES com o gene da IL-10, alguns estudos não obtiveram êxito (tabela 7)<sup>162;168;169;171</sup>, porém determinados pesquisadores acreditam que o polimorfismo da IL-10 esteja associado com certas manifestações clínicas da doença, podendo apontar para um melhor prognóstico da doença<sup>99;163;174;176;177</sup>. Em pacientes asiáticos, foi relatada uma associação do alelo G do polimorfismo -1082 da IL-10 em pacientes com LES<sup>164</sup>. Além disto, outro estudo observou uma associação com o homozigoto GG do polimorfismo -1082 em pacientes com LES<sup>170</sup>.

Muito embora determinados estudos tivessem observado uma frequência maior do haplótipo ATA<sup>165</sup> e do haplótipo ACC<sup>160</sup> nos pacientes com LES comparado com pacientes saudáveis, outro estudo somente relatou uma susceptibilidade para a doença na presença do genótipo GCC/GCC<sup>159</sup>. Outros estudos citaram como marcadores para a doença o polimorfismo -627 A/C da IL-10<sup>175</sup> e o polimorfismo IL10 -592 A/C<sup>176;177</sup>.

Tabela 7. Análise do polimorfismo da interleucina 10 (IL-10) em Lupus Eritematoso Sistêmico

Gene	Doença	Polimorfismo	Resultados	Número (N)		Estudo [Ref]
				Pacientes	Controles	
IL-10	Lupus Eritematoso Sistêmico					
		(-) <b>1082G/A</b> ; (-) <b>819C/T</b> ; (-) <b>592C/A</b>	associação do genótipo GCC/GCC (OR=2,2; P=0,03) associação do haplótipo ACC (OR=1,47; P=0,03) associação do genótipo -592 CC (OR=2,75; P=0,04) sem associação haplótipo GCC associado com anti-Ssa (P<0,05) sem associação associação do alelo -1082 G (OR=1,35; P=0,039) associação do haplótipo ATA (OR=1,51; P=0,031) associação do genótipo ATA/ATA (P<0,05)	116 390 554 248 76 120 2391 2828 172	151 318 708 343 199 274 3483 4008 215	Rosado et al. 2008 [159] Hirankarn et al. 2006 [160] Rianthavorn et al. 2004 [161] Suarez et al. 2005 [162] Lazarus et al. 1997 [163] Crawley et al. 1999 [110] Nath et al. 2005 [164] Song et al. 2013 [165] Lin et al. 2010 [166]
		(-) <b>1087G/A</b> ; (-) <b>824C/T</b> ; (-) <b>597C/A</b> (-) <b>1117G/A</b> ; (-) <b>854C/T</b> ; (-) <b>627C/A</b> (-) <b>3575T/A</b> ; (-) <b>2849G/A</b> ; (-) <b>2763C/A</b>	haplótipo ATA associado com acometimento renal (OR=3,62; P<0,001) associação do genótipo GCC/GCC (OR=2,24; P=0,0022) sem associação sem associação associação do alelo -3575A (P=0,02) e alelo -2763A (P=0,009) associação do haplótipo GG (OR=3,33; P=0,028) sem associação associação do alelo G (OR=3,36; P=0,001) associação do alelo G (OR=1,23; P<0,05)	88 103 554 217 60 64 180 2396	83 300 708 173 64 57 163 3653	Mok et al. 1998 [99] Sobkowiak et al. 2009 [167] Chong et al. 2004 [168] D'Alfonso et al. 2002 [169] Gibson et al. 2013 [98] Khoa et al. 2005 [170] Dijstelbloem et al. 2002 [171] Zhou et al. 2013 [172] meta-análise Wang et al. 2013 [173]
		(-) <b>1082 G/A</b>	proteção do alelo A contra eventos cardiovasculares (P<0,05) associação do alelo A (OR=1,21; P=0,003)	26 119	26 100	Fei et al. 2004 [174] Lin et al. 2007 [175]
		(-) <b>592 C/A</b>	associação do alelo C com glomerulonefrite (OR=3,21; P=0,001) associação do alelo C com SLICC/ACR Damage Index (OR=1,70; P=0,007)	265 350	100 330	Zhu et al. 2005 [176] Sung et al. 2006 [177]

Na Artrite Idiopática Juvenil Sistêmica (AIJS) um estudo demonstrou uma forte associação do promotor -1082G/A da IL-10 em pacientes com a doença. Avaliando os haplótipos dos polimorfismos -1082G/A, -819C/T, e -592C/A, o estudo reportou a associação de um haplótipo raro, o GTC, mais frequente em pacientes do que em indivíduos saudáveis. O heterozigoto GA do polimorfismo -1082 e o haplótipo GCC foram fatores de proteção para o desenvolvimento da AIJS<sup>179</sup>. Por outro lado, outro estudo somente observou associação com o alelo A do polimorfismo -1082<sup>178</sup>.

Por fim, um estudo investigou os polimorfismos -1082 G/A, -819 C/T e -592 C/A em população chinesa com espondilite anquilosante (EA), e foi sugestivo de que o haplótipo GCC estava associado com um alto risco para desenvolver a doença, comparado com o haplótipo ATA<sup>180</sup>. Contudo, outro estudo não observou os mesmos resultados, acreditando não existir associação dos polimorfismos genéticos da IL-10 em pacientes com EA no norte da Europa<sup>181</sup>.

**Tabela 8.** Análise do polimorfismo da interleucina 10 (IL-10) em Artrite Idiopática Juvenil Sistêmica e Espondilite Anquilosante

Gene	Doença	Polimorfismo	Resultados	Número (N)		Estudo [Ref]
				Pacientes	Controles	
<b>IL-10</b>						
	<i>Artrite Idiopática Juvenil Sistêmica</i>					
		(-) <b>1082</b> G/A; (-) <b>819</b> C/T; (-) <b>592</b> C/A	associação do alelo A (OR=1,33; P=0,031) associação do haplótipo GTC (P<0,001) e proteção com o haplótipo GCC (P<0,001)	172	473	Fife et al. 2006 [178] Möller et al. 2010 [179]
	<i>Espondilite Anquilosante</i>					
		(-) <b>1082</b> G/A; (-) <b>819</b> C/T; (-) <b>592</b> C/A	associação do haplótipo GCC (OR=2,19; P=0,02)	110	120	Lv et al. 2011 [180]
		(-) <b>1087</b> G/A; (-) <b>824</b> C/T; (-) <b>597</b> C/A	sem associação	468	*	Goedecke et al. 2003 [181]

\*O estudo somente avaliou a interação entre os pacientes

Diante da revisão apresentada e em função do desconhecimento da imunopatogenia da esclerose sistêmica, o que se reflete na inexistência de terapias eficazes, faz-se necessário estudar a influência do polimorfismo dos genes da interleucina 10 (IL-10), do fator de transcrição nuclear kappa das células B do tipo 1 (NFKB1) e do receptor de quimiocina 2 e seu ligante (CXCR2 e CXCL8) nessa patologia. A identificação de associações entre esses polimorfismos e a esclerose sistêmica poderia impactar não somente na melhor compreensão da fisiopatogênese, mas também na identificação de grupos de risco para o desenvolvimento da doença e de subgrupos de pacientes com melhor ou pior prognósticos.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Primário**

Investigar o polimorfismo dos genes da interleucina 10 (-1082, -819, -592), NFKB1 (-94 ins/delATTG), CXCR2 (+1208) e CXCL8 (-251) em um grupo de pacientes com esclerose sistêmica (ES) e comparar com um grupo controle de indivíduos saudáveis.

### **3.1 Objetivos Secundários**

- Avaliar a frequência dos polimorfismos do gene IL-10 (-1082, -819, -592) através do método PCR-SSP, em pacientes com ES e grupo controle;
- Avaliar a frequência do polimorfismo do gene CXCR2 (+1208) e CXCL8 (-251) através do método PCR-SSP, em pacientes com ES e grupo controle;
- Avaliar a frequência do polimorfismo do gene NFKB1 (-94 ins/delATTG) através do método PCR-RFLP, em pacientes com ES e grupo controle;
- Avaliar associação dos polimorfismos com características clínicas e laboratoriais;
- Avaliar a frequência dos polimorfismos genéticos em pacientes com diferentes formas da ES, como a forma difusa e limitada;

## REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Arnett, FC. HLA and autoimmunity in scleroderma (systemic sclerosis). *Int Rev Immunol* 12 (2-4), 107 (1995).
2. Chiffлот H., Fautrel B., Sordet C., Chatelus E., and Sibilia J., Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. *Semin Arthritis Rheum* 37 (4), 223 (2008).
3. Sgonc R, Gruschwitz MS, Boeck G, Sepp N, Gruber J, and Wick G. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. *Arthritis Rheum* 43 (11), 2550 (2000).
4. Varga JA and Trojanowska M, Fibrosis in systemic sclerosis. *Rheum Dis Clin North Am* 34 (1), 115 (2008).
5. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Rowell N, and Wollheim F. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 15 (2), 202 (1988).
6. Perlish JS and Fleischmajer R. Collagen synthesis by scleroderma fibroblasts in culture: a reply. *Arthritis Rheum* 20 (7), 1440 (1977).
7. LeRoy EC. Systemic sclerosis. A vascular perspective. *Rheum Dis Clin North Am* 22 (4), 675 (1996).
8. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, and Tedder TF. Altered B lymphocyte function induces systemic autoimmunity in systemic sclerosis. *Mol Immunol* 41 (12), 1123 (2004).
9. Eming SA, Krieg T and Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 127 (3), 514 (2007).

10. Fleischmajer R, Perlish JS, and Reeves JR. Cellular infiltrates in scleroderma skin. *Arthritis Rheum* 20 (4), 975 (1977).
11. Ishikawa O and Ishikawa H. Macrophage infiltration in the skin of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 19 (8), 1202 (1992).
12. Holcombe RF, Baethge BA, Wolf RE, Betzing KW, and Stewart RM. Natural killer cells and gamma delta T cells in scleroderma: relationship to disease duration and anti-Scl-70 antibodies. *Ann Rheum Dis* 54 (1), 69 (1995).
13. Eckes B, Hunzelmann N, Moinzadeh P, and Krieg T. Scleroderma-news to tell. *Arch Dermatol Res* 299 (3), 139 (2007).
14. Hata R, Akai J, Kimura A, et al. Association of functional microsatellites in the human type I collagen alpha2 chain (COL1A2) gene with systemic sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 272 (1), 36 (2000).
15. Krieg T, Abraham D, and Lafyatis R. Fibrosis in connective tissue disease: the role of the myofibroblast and fibroblast-epithelial cell interactions. *Arthritis Res Ther* 9 Suppl 2, S4 (2007).
16. Kraling BM, Maul GG, and Jimenez SA. Mononuclear cellular infiltrates in clinically involved skin from patients with systemic sclerosis of recent onset predominantly consist of monocytes/macrophages. *Pathobiology* 63 (1), 48 (1995).
17. Hasegawa M, Sato S, and Takehara K. Augmented production of transforming growth factor-beta by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res* 296 (2), 89 (2004).
18. Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev* 8 (3), 171 (1997).
19. Salmon-Her V, Serpier H, Nawrocki B, et al. Expression of interleukin-4 in scleroderma skin specimens and scleroderma fibroblast cultures. Potential role in fibrosis. *Arch Dermatol* 132 (7), 802 (1996).
20. Mouthon L, Garcia De La Pena-Lefebvre P, Chanseaud Y, et al. Pathogenesis of systemic scleroderma: immunological aspects. *Ann Med Interne (Paris)* 153 (3), 167 (2002).

21. Quan TE, Cowper S, Wu SP, Bockenstedt LK, and Bucala R. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. *Int J Biochem Cell Biol* 36 (4), 598 (2004).
22. Tan FK. Systemic sclerosis: the susceptible host (genetics and environment). *Rheum Dis Clin North Am* 29 (2), 211 (2003).
23. Parks CG, Conrad K, and Cooper GC. Occupational exposure to crystalline silica and autoimmune disease. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 5, 793 (1999).
24. Hausteiner UF and Andereggs U. Silica induced scleroderma--clinical and experimental aspects. *J Rheumatol* 25 (10), 1917 (1998).
25. Tan FK and Arnett FC. Genetic factors in the etiology of systemic sclerosis and Raynaud phenomenon. *Curr Opin Rheumatol* 12 (6), 511 (2000).
26. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, et al. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum* 44 (6), 1359 (2001).
27. Zhou X, Tan FK, Wang N, Xiong M, et al. Genome-wide association study for regions of systemic sclerosis susceptibility in a Choctaw Indian population with high disease prevalence. *Arthritis Rheum* 48 (9), 2585 (2003).
28. Lambert NC, Distler O, Muller-Ladner U, et al. HLA-DQA1\*0501 is associated with diffuse systemic sclerosis in Caucasian men. *Arthritis Rheum* 43 (9), 2005 (2000).
29. Reveille JD, Owerbach D, Goldstein R, et al. Association of polar amino acids at position 26 of the HLA-DQB1 first domain with the anticentromere autoantibody response in systemic sclerosis (scleroderma). *J Clin Invest* 89 (4), 1208 (1992).
30. Reveille JD, Brady J, MacLeod-St Clair M, and Durban E. HLA-DPB1 alleles and autoantibody subsets in systemic lupus erythematosus, Sjogren's syndrome and progressive systemic sclerosis: a question of disease relevance. *Tissue Antigens* 40 (1), 45 (1992).
31. Hudson LL, Rocca KM, Kuwana M, and Pandey JP. Interleukin-10 genotypes are associated with systemic sclerosis and influence disease-associated autoimmune responses. *Genes Immun* 6 (3), 274 (2005).

32. Granel B, Chevillard C, Allanore Y, et al. Evaluation of interleukin 13 polymorphisms in systemic sclerosis. *Immunogenetics* 58 (8), 693 (2006).
33. Sato H, Lagan AL, Alexopoulou C, et al. The TNF-863A allele strongly associates with anticentromere antibody positivity in scleroderma. *Arthritis Rheum* 50 (2), 558 (2004).
34. Crilly, Hamilton J, Clark CJ, Jardine A, and Madhok R, Analysis of transforming growth factor beta1 gene polymorphisms in patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 61 (8), 678 (2002).
35. Hutyrova, J. Lukac, V. Bosak, M. Buc, du Bois R, and Petrek M. Interleukin 1alpha single-nucleotide polymorphism associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 31 (1), 81 (2004).
36. Zhou X, Tan FK, Stivers DN, and Arnett FC. Microsatellites and intragenic polymorphisms of transforming growth factor beta and platelet-derived growth factor and their receptor genes in Native Americans with systemic sclerosis (scleroderma): a preliminary analysis showing no genetic association. *Arthritis Rheum* 43 (5), 1068 (2000).
37. Campbell H, Rudan I. Interpretation of genetic association studies in complex disease. *Pharmacogenomics J* 2002;2(6):349–60
38. Rueda B, Broen J, Simeon C, et al. The STAT4 gene influences the genetic predisposition to systemic sclerosis phenotype. *Hum Mol Genet* 2009; 18:2071–2077.;
39. Tsuchiya N, Kawasaki A, Hasegawa M, et al. Association of STAT4 polymorphism with systemic sclerosis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis* 2009; 68:1375–1376.
40. Radstake TR, Gorlova O, Rueda B, et al. Genome-wide association study of systemic sclerosis identifies CD247 as a new susceptibility locus. *Nat Genet* 2010; 42:426–429.
41. Kuwana M, Inoko H, Kameda H et al.: Association of human leucocyte antigen class II genes with autoantibody profiles, but not with disease susceptibility in Japanese patients with systemic sclerosis. *Intern Med* 1999; 38: 336-44.;
42. Gilchrist Fc, Bunn C, Foley Pj et al.: Class II HLA associations with autoantibodies in scleroderma: a highly significant role for HLA-DP. *Genes Immun* 2001; 2: 76-81

43. Arnett Fc, Gourh P, Shete S et al.: Major Histocompatibility Complex (MHC) class II alleles, haplotypes, and epitopes which confer susceptibility or protection in the fibrosing autoimmune disease systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 822-7.
44. Carmona FD, Gutala R, Simeón CP, et al., Spanish Scleroderma Group. Novel identification of the IRF7 region as an anticentromere autoantibody propensity locus in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2012; 71:114– 119. ;
45. Ito I, Kawaguchi Y, Kawasaki A, et al. Association of a functional polymorphism in the IRF5 region with systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum* 2009; 60:1845–1850. ;
46. Gorlova O, Martin JE, Rueda B, et al. Identification of novel genetic markers associated with clinical phenotypes of systemic sclerosis through a genomewide association strategy. *PLoS Genet* 2011; 7:e1002178.
47. Broen JC, Bossini-Castillo L, van Bon L, et al., Spanish Systemic Sclerosis Group. A rare polymorphism in the gene for Toll-like receptor 2 is associated with systemic sclerosis phenotype and increases the production of inflammatory mediators. *Arthritis Rheum* 2012; 64:264–271.
48. Martin JE, Broen JC, Carmona FD, et al. Identification of CSK as a systemic sclerosis genetic risk factor through Genome Wide Association Study followup. *Hum Mol Genet* 2012; 21:2825–2835
49. Gourh P, Agarwal SK, Martin E, et al. Association of the C8orf13-BLK region with systemic sclerosis in North-American and European populations. *J Autoimmun* 2010; 34:155–162
50. Ito I, Kawaguchi Y, Kawasaki A, et al. Association of the FAM167A-BLK region with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2010; 62:890–895.
51. Coustet B, Dieude P, Guedj M, et al. C8orf13-BLK is a genetic risk locus for systemic sclerosis and has additive effects with BANK1: results from a large French cohort and meta-analysis. *Arthritis Rheum* 2011; 63:2091–2096.

52. Gourh P, Agarwal Sk, Divecha D et al.: Polymorphisms in TBX21 and STAT4 increase the risk of systemic sclerosis: evidence of possible gene-gene interaction and alterations in Th1/Th2 cytokines. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 3794-806.
53. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kB. *Genes Dev* 2004;18:2195–2224
54. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004;25:280–288
55. Le Beau MM., Ito C., Cogswell P., Espinosa R. , Fernald A.A. and Baldwin AS. Jr. Chromosomal localization of the genes encoding the p50/p105 subunits of NF-kappa B (NFKB2) and the I kappa B/MAD-3 (NFKBI) inhibitor of NF-kappa B to 4q24 and 14q13, respectively. *Genomics* 1992; 14: 529-531
56. Liptay S., Schmid R.M., Perkins N.D., Meltzer P., Altherr M.R., McPherson J.D., Wasmuth J.J. and Nabel G.J. (1992). Related subunits of NF-kappa B map to two distinct loci associated with translocations in leukemia, NFKB1 and NFKB2. *Genomics* 13, 287- 292
57. Mathew S., Murty V.V., Dalla-Favera R. and Chaganti R.S. (1993). Chromosomal localization of genes encoding the transcription factors, c-rel, NF-kappa Bp50, NF-kappa Bp65, and Iy-10 by fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 8, 191-193
58. Brownell E., Kozak C.A., Fowle J.R. 3rd, Modi W.S., Rice N.R. and O'Brien S.J. (1986). Comparative genetic mapping of cellular rel sequences in man, mouse, and the domestic cat. *Am. J. Hum. Genet.* 39, 194-202
59. Beinke S. and Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NFkappaB2 in immune cell biology. *Biochem. J.* 2004; 382: 393-409
60. Dejardin E., Deregowski V., Greimers R., Cai Z., Chouaib S., Merville M. P. and Bours V. Regulation of major histocompatibility complex class I expression by NF-kappaB-related proteins in breast cancer cells. *Oncogene* 1998; 16: 3299-3307
61. Miagkov AV., Kovalenko DV., Brown CE., Didsbury JR., Cogswell JP., Stimpson SA., et al. NFkappaB activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 13859-13864.

62. Wong H.K., Kammer G.M., Dennis G. and Tsokos G.C. Abnormal NF-kappa B activity in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus is associated with decreased p65- RelA protein expression. *J. Immunol.* 1999; 163: 1682-1689
63. Pimentel-Muinos FX and Seed B. Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. *Immunity* 1999; 11: 783–793
64. Lin L, DeMartino GN, and Greene WC. Co-translational biogenesis of NF-B p50 by the 26S proteasome. *Cell* 1998; 92: 819–828
65. Ghosh S, May MJ, Kopp EB NF-kB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16: 225–260
66. Elewaut, D. et al. (1999) NF-kB is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J. Immunol.* 163, 1457–1466
67. Wickremasinghe MI, Thomas LH, Friedland JS. Pulmonary epithelial cells are a source of IL-8 in the response to Mycobacterium tuberculosis: essential role of IL-1 from infected monocytes in a NF-kB-dependent network. *J. Immunol.* 1999; 163: 3936–3947
68. Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2001; 2: 95–101
69. Yamamoto T. Chemokines and chemokine receptors in scleroderma [review]. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;140:345–56
70. Tamby MC, Chanseaud Y, Guillevin L, Mouthon L. New insights into the pathogenesis of systemic sclerosis [review]. *Autoimmun Rev* 2003;2:152–7
71. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation [review]. *N Engl J Med* 2006;354:610–21
72. Atamas SP, White B. The role of chemokines in the pathogenesis of scleroderma [review]. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:772–7.
73. Hebert C, Vitangcol R, and Baker J. Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding. *J Biol Chem* 1991; 266: 18989–18994

74. Norgauer J, Krutmann J, Dobos GJ, Traynor-Kaplan AE, Oades ZG, and Schraufstatter IU. Actin polymerization, calcium- transients, and phospholipid metabolism in human neutrophils after stimulation with interleukin-8 and N-formyl peptide. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 310–314
75. Chuntharapai A and Kim KJ. Regulation of the expression of the IL-8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor. *J Immunol* 155: 2587–2594, 1995
76. Qi J, Martin T, Foster DC, Whitmore T, and Goodman RB. Antibodies against the N-terminus of IL-8 receptor A inhibit neutrophil chemotaxis. *Biochem Biophys Res Commun* 219: 405– 411, 1996
77. Baggiolini M, Walz A, and Kunkel S. Neutrophil activating peptide/interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 84: 1045–1049, 1989
78. Wu D, LaRosa GJ, and Simon MI. G-protein-coupled signal transduction pathways for interleukin-8. *Science* 1993; 261: 101–103
79. Schraufstatter IU., Chung J, and Burger M. IL-8 activates endothelial cell CXCR1 and CXCR2 through Rho and Rac signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280: L1094–L1103
80. Witherow, D. S., T. R. Garrison, W. E. Miller, and R. J. Lefkowitz. b-Arrestin inhibits NF-kB activity by means of its interaction with the NF-kB inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 8603–8607.
81. Koch AE, Kronfeld-Harrington LB, Szekanecz Z, Cho MM, Haines GK, Harlow LA, et al. In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis: their role in early and late disease. *Pathobiology* 1993; 61:239–46.
82. Bolster MB, Ludwicka A, Sutherland SE, Strange C, Silver RM. Cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1997;40:743–51.
83. Kadono T, Kikuchi K, Ihn H, Takehara K, Tamaki K. Increased production of interleukin 6 and interleukin 8 in scleroderma fibroblasts. *J Rheumatol* 1998;25:296–301.

84. Furuse S, Fujii H, Kaburagi Y, Fujimoto M, Hasegawa M, Takehara K, et al. Serum concentrations of the CXC chemokines interleukin 8 and growth-regulated oncogene are elevated in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2003;30:1524–8
85. Pantelidis P, Southcott AM, Black CM, Du Bois RM. Up-regulation of IL-8 secretion by alveolar macrophages from patients with fibrosing alveolitis: a subpopulation analysis. *Clin Exp Immunol*. 1997;108(1):95-104
86. Briggs DC, Vaughan RW, Welsh KI et al. Immunogenetic prediction of pulmonary fibrosis in systemic sclerosis. *Lancet* 1991; 338:661–2.
87. Santos JC, de Brito CA, Futata EA, Azor MH, Orii NM, Maruta CW, ET AL. Up-regulation of chemokine C-C ligand 2 (CCL2) and C-X-C chemokine 8 (CXCL8) expression by monocytes in chronic idiopathic urticaria. *Clin Exp Immunol*. 2012;167(1):129-36
88. Granel B, Chevillard C, Allanore Y, Arnaud V, Cabantous S, Marquet S, et al. Evaluation of interleukin 13 polymorphisms in systemic sclerosis. *Immunogenetics* 2006;58:693–9.
89. Matsushita T, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. *J Rheumatol* 2006;33:275–84.
90. Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin- 6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* 2001; 27:140–6
91. Mavalia C, Scaletti C, Romagnani P, Carossino AM, Pignone A, Emmi L, et al. Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. *Am J Pathol* 1997;151: 1751–8
92. Banchereau J, Pascual V, O'Garra A. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat Immunol*. 2012;13(10):925-31.
93. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginet J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010 Oct; 21(5):331–44
94. Sun J, Madan R, Karp CL, Braciale TJ. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med*. 2009; 15(3):277–84.

95. Ienvenu J, Doche C, Gutowski MC, Lenoble M, Lepape A, Erdix JP. Production of proinflammatory cytokines and cytokines involved in the Th1/Th2 balance is modulated by pentoxifylline. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;25:S80–4
96. Eskdale J, Kube D, Gallagher G. A second polymorphic dinucleotide repeat in the 5' flanking region of the human IL-10 gene. *Immunogenetics* 1996;45:82
97. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphisms in the interleukin 10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997;24:1–8
98. Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RGJ, Huizinga TWJ, Kimberly RP. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001;166:3915–22.
99. Mok CC, Lanchbury JS, Chan DW, Lau SC. Interleukin 10 promoter polymorphisms in southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998;41:1090–5
100. Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation* 2003;75:711–7
101. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102:1369–76
102. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E, Craighead N, DiMercurio BS, Koziol DE, et al. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation* 2001;72:1444–50
103. Beretta L, Bertolotti F, Cappiello F, Barili M, Masciocchi M, Toussoun K, et al. Interleukin-1 gene complex polymorphisms in systemic sclerosis patients with severe restrictive lung physiology. *Hum Immunol* 2007;68:603–9

104. Mattuzzi S, Barbi S, Carletto A, Ravagnani V, Moore PS, Bambara LM, et al. Association of polymorphisms in the IL1B and IL2 genes with susceptibility and severity of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2007;34:997–1004
105. Crilly A, Hamilton J, Clark CJ, Jardine A, Madhok R. Analysis of the 5' flanking region of the interleukin 10 gene in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42: 1295–8
106. Hutyrova B, Lukac J, Bosak V, Buc M, du Bois R, Petrek M. Interleukin 1 single nucleotide polymorphism associated with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2004;31:81–4
107. Ommen ES, Winston JA, Murphy B. Medical risks in living kidney donors: absence of proof is not proof of absence. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;1:885–95
108. Moore JH. The ubiquitous nature of epistasis in determining susceptibility to common human diseases. *Hum Hered* 2003; 56:73–82
109. Yamamoto T, Eckers B, Kreig T. Effect of interleukin 10 on the gene expression of type 1 collagen, fibronectin and decorin in human skin fibroblasts: Differential regulation by transforming growth factor and monocyte chemoattractant protein-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:200–5.
110. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo P. Polymorphic haplotypes of the interleukin 10 5' flanking region determine variable interleukin 10 transcription and are associated with phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:1101–8
111. Hewagama A, Richardson B. The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2009;33(1):3-11
112. Renzoni E, Lympany P, Sestini P, Pantelidis P, Wells A, Black C, et al. Distribution of novel polymorphisms of the interleukin-8 and CXCR1 and 2 genes in systemic sclerosis and cryptogenic fibrosing alveolitis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1633–40.
113. Lee EB, Zhao J, Kim JY, Xiong M, Song YW. Evidence of potential interaction of chemokine genes in susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2007 Jul;56(7):2443-8.

114. Emonts M, Hazes MJ, Houwing-Duistermaat JJ, van der Gaast-de Jongh CE, de Vogel L, Han HK, et al. Polymorphisms in genes controlling inflammation and tissue repair in rheumatoid arthritis: a case control study. *BMC Med Genet*. 2011; 7:12-36.
115. Lo SF, Huang CM, Lin HC, Chen WC, Tsai CH, Tsai FJ. Cytokine (IL-6) and chemokine (IL-8) gene polymorphisms among rheumatoid arthritis patients in Taiwan. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26(4):632-7.
116. Sandling JK, Garnier S, Sigurdsson S, Wang C, Nordmark G, Gunnarsson I, et al. A candidate gene study of the type I interferon pathway implicates IKBKE and IL8 as risk loci for SLE. *Eur J Hum Genet*. 2011;19(4):479-84.
117. Huang CM, Huo AP, Tsai CH, Chen CL, Tsai FJ. Lack of association of interleukin-6 and interleukin-8 gene polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Lab Anal*. 2006;20(6):255-9.
118. Sánchez E, Sabio JM, Callejas JL, de Ramón E, Garcia-Portales R, García-Hernández FJ, et al: Association study of genetic variants of pro-inflammatory chemokine and cytokine genes in systemic lupus erythematosus. *BMC Med Genet* 2006; 7: 48
119. Codullo V, Baldwin HM, Singh MD, Fraser AR, Wilson C, Gilmour A, Hueber AJ, Bonino C, McInnes IB, Montecucco C, Graham GJ. An investigation of the inflammatory cytokine and chemokine network in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jun;70(6):1115-21.
120. H Kato, N Tsuchiya and K Tokunaga. Single nucleotide polymorphisms in the coding regions of human CXC-chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CXCR3. *Genes and Immunity* 2000; 1: 330–337.
121. Orozco G, Sánchez E, Collado MD, López-Nevot MA, Paco L, García A, ET AL. Analysis of the functional NFKB1 promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*. 2005;65(2):183-6.
122. Dieguez-Gonzalez R, Akar S, Calaza M, Perez-Pampin E, Costas J, Torres M, Vicario JL et al. Genetic variation in the nuclear factor kappaB pathway in relation to susceptibility to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(4):579-83.

123. Martínez A, Sánchez E, Valdivia A, Orozco G, López-Nevot MA, Pascual-Salcedo D, et al. Epistatic interaction between FCRL3 and NFkappaB1 genes in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(9):1188-91.
124. López-Mejías R, García-Bermúdez M, González-Juanatey C, Castañeda S, Miranda-Fillooy JA, Gómez-Vaquero C, et al. NFKB1-94ATTG ins/del polymorphism (rs28362491) is associated with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis*. 2012 Oct;224(2):426-9.
125. Gao M, Wang CH, Sima X, Han XM. NFKB1 -94 insertion/deletion ATTG polymorphism contributes to risk of systemic lupus erythematosus. *DNA Cell Biol*. 2012;31(4):611-5.
126. Kim TH, Stone MA, Rahman P, Yoo DH, Park YW, Payne U, et al. Interleukin 1 and nuclear factor-kappaB polymorphisms in ankylosing spondylitis in Canada and Korea. *J Rheumatol* 2005; 32: 1907–10.
127. Zou YF, Wang F, Feng XL, Tao JH, Zhu JM, Pan FM, Su H. Association of NFKB1 -94ins/delATTG promoter polymorphism with susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases: a meta-analysis. *Tissue Antigens*. 2011 Jan;77(1):9-17.
128. Willeke P, Gaubitz M, Schotte H, Becker H, Domschke W, Schlüter B. The role of interleukin-10 promoter polymorphisms in primary Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol*. 2008 Jul-Aug;37(4):293-9
129. Font J, García-Carrasco M, Ramos-Casals M, Aldea AI, Cervera R, Ingelmo M, Vives J, Yagüe J. The role of interleukin-10 promoter polymorphisms in the clinical expression of primary Sjögren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2002 Sep;41(9):1025-30
130. Origuchi T, Kawasaki E, Ide A, Kamachi M, F Tanaka, H Ida, A Kawakami, K Migita, K Eguchi Correlation between interleukin 10 gene promoter region polymorphisms and clinical manifestations in Japanese patients with Sjo"gren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2003;62:1117–1118
131. Hulkkonen J, Pertovaara M, Anttonen J, Lahdenpohja N, Pasternack A, Hurme M. Genetic association between interleukin-10 promoter region polymorphisms and primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2001;44:176–9.

132. Rischmueller M, Limaye V, Lester S, Downie-Doyle S, Pile K, Bardy P, et al. Polymorphisms of the interleukin 10 gene promoter are not associated with anti-Ro autoantibodies in primary Sjögren's syndrome. *J Rheumatol* 2000;27:2945–6. Correction in: *J Rheumatol* 2001;28:684.
133. Márka M, Bessenyei B, Zeher M, Semsei I. IL-10 promoter -1082 polymorphism is associated with elevated IL-10 levels in control subjects but does not explain elevated plasma IL-10 observed in Sjögren's syndrome in a Hungarian cohort. *Scand J Immunol*. 2005 Nov;62(5):474-80
134. Peng WJ, Wang BX, Pan HF, Tao JH, Zhang JQ, He Q, et al. Association of the interleukin-10 1082G/A, 819C/T and 3575T/A gene polymorphisms with systemic sclerosis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2012;39(6):6851-5
135. Beretta L, Cappiello F, Barili M, Scorza R. Proximal interleukin-10 gene polymorphisms in Italian patients with systemic sclerosis. *Tissue Antigens*. 2007;69(4):305-12.
136. Ates O, Müsellim B, Ongen G, Topal-Sarikaya A. Association between 'interleukin' 10 gene (IL10) polymorphisms and systemic sclerosis with interstitial lung involvement. *Rheumatol Int*. 2008;28(11):1123-6.
137. Beretta L, Cappiello F, Moore JH, Barili M, Greene CS, Scorza R. Ability of epistatic interactions of cytokine single-nucleotide polymorphisms to predict susceptibility to disease subsets in systemic sclerosis patients. *Arthritis Rheum*. 2008 Jul 15;59(7):974-83.
138. Ursum J, van der Weijden MA, van Schaardenburg D, Prins AP, Dijkmans BA, Twisk JW, Crusius JB, van der Horst-Bruinsma IE. IL10 GGC haplotype is positively and HLA-DQA1\*05-DQB1\*02 is negatively associated with radiographic progression in undifferentiated arthritis. *J Rheumatol*. 2010 Jul;37(7):1431-8.
139. Hajeer AH, Lazarus M, Turner D, Mageed RA, Vencovsky J, Sinnott P, et al. IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 1998;27(2):142-5.
140. Moreno OM, Gonzalez CI, Saaibi DL, Otero W, Badillo R, Martin J, Ramirez G (2007) Polymorphisms of IL-10 gene promoter and rheumatoid arthritis in a Colombian population. *Biomedica* 27:56–65

141. Pawlik A, Kurzawski M, Szklarz BG, Herczynska M, Drozdziak M. Interleukin-10 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2005; 24:480–484
142. Gambhir D, Lawrence A, Aggarwal A, Misra R, Mandal SK, Naik S. Association of tumor necrosis factor alpha and IL-10 promoter polymorphisms with rheumatoid arthritis in North Indian population. *Rheumatol Int* 2010; 30:1211–1217
143. Hee CS, Gun SC, Naidu R, Gupta E, Somnath SD, Radhakrishnan AK. Comparison of single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-10 gene promoter between rheumatoid arthritis patients and normal subjects in Malaysia. *Mod Rheumatol*. 2007;17(5):429-35.
144. Coakley G, Mok CC, Hajeer AH, Ollier WE, Turner D, Sinnott PJ, Hutchinson IV, Panayi GS, Lanchbury JS (1998) Interleukin- 10 promoter polymorphisms in rheumatoid arthritis and Felty's syndrome. *Br J Rheumatol* 37:988–991
145. Trajkov D, Mishevaska-Perchinkova S, Karadzova-Stojanoska A, Petlichkovski A, Strezova A, Spiroski M. Association of 22 cytokine gene polymorphisms with rheumatoid arthritis in population of ethnic Macedonians. *Clin Rheumatol*. 2009 Nov;28(11):1291-300.
146. Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Wolbink GJ, de Vries N, Tak PP, Dijkmans BA, Crusius JB, van der Horst-Bruinsma IE. Anti-adalimumab antibodies in rheumatoid arthritis patients are associated with interleukin-10 gene polymorphisms. *Arthritis Rheum*. 2009 Aug;60(8):2541-2.
147. Nemec P, Pavkova-Goldbergova M, Gatterova J, Fojtik Z, Vasku A, Soucek M. Association of the -1082 G/A promoter polymorphism of interleukin-10 gene with the autoantibodies production in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2009 Aug;28(8):899-905.
148. Lard LR, van Gaalen FA, Schonkeren JJ, Pieterman EJ, Stoeken G, Vos K, Nelissen RG, Westendorp RG, Hoeben RC, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. Association of the -2849 interleukin-10 promoter polymorphism with autoantibody production and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003;48(7):1841-8.

149. Padyukov L, Hytönen AM, Smolnikova M, Hahn-Zoric M, Nilsson N, Hanson LA, Tarkowski A, Klareskog L. Polymorphism in promoter region of IL10 gene is associated with rheumatoid arthritis in women. *J Rheumatol*. 2004 Mar;31(3):422-5.
150. Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulié P, Nourhashemi F, Enault G, Abbal M et al. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999;42(6):1093-100.
151. de Paz B, Alperi-López M, Ballina-García FJ, Prado C, Mozo L, Gutiérrez C, et al. Interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha genotypes in rheumatoid arthritis--association with clinical response to glucocorticoids. *J Rheumatol*. 2010;37(3):503-11.
152. Zhang J, Zhang Y, Jin J, Li M, Xie K, Wen C, Cheng R, Chen C, Lu J. The -1082A/G polymorphism in the Interleukin-10 gene and the risk of rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Cytokine*. 2011 Nov;56(2):351-5
153. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2012 Jan;39(1):81-7.
154. Huang CM, Tsai CH, Chen CL, Chang CP, Tsai FJ. No relationship of -627 interleukin-10 promoter polymorphism in Chinese patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 2005 Oct;25(8):576-9.
155. Ying B, Shi Y, Pan X, Song X, Huang Z, Niu Q, Cai B, Wang L. Association of polymorphisms in the human IL-10 and IL- 18 genes with rheumatoid arthritis. *Mol Biol Rep* 2011; 38:379–385
156. Paradowska-Gorycka A, Trefler J, Maciejewska-Stelmach J, Lacki JK. Interleukin-10 gene promoter polymorphism in Polish rheumatoid arthritis patients. *Int J Immunogenet* 2010; 37:225– 231
157. Marinou I, Healy J, Mewar D, Moore DJ, Dickson MC, Binks MH, Montgomery DS, Walters K, Wilson AG. Association of interleukin-6 and interleukin-10 genotypes with

- radiographic damage in rheumatoid arthritis is dependent on autoantibody status. *Arthritis Rheum.* 2007 Aug;56(8):2549-56.
158. Rosado S, Rua-Figueroa I, Vargas JA, Garcia-Laorden MI, Losada-Fernandez I, Martin-Donaire T, Perez-Chacon G, Rodriguez-Gallego C, Naranjo-Hernandez A, Ojeda-Bruno S, Citores MJ, Perez-Aciego P. Interleukin-10 promoter polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus from the Canary Islands. *Int J Immunogenet.* 2008 Jun;35(3):235-42
  160. Hirankarn N, Wongpiyabovorn J, Hanvivatvong O, Netsawang J, Akkasilpa S, Wongchinsri J, Hanvivadhanakul P, Korkit W, Avihingsanon Y. The synergistic effect of FC gamma receptor IIa and interleukin-10 genes on the risk to develop systemic lupus erythematosus in Thai population. *Tissue Antigens.* 2006 Nov;68(5):399-406
  161. Chong WP, Ip WK, Wong WH, Lau CS, Chan TM, Lau YL . Association of interleukin-10 promoter polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2004 Sep;5(6):484-92
  162. Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. *Transplantation* 2003;75:711–7
  163. Lazarus M, Hajeer AH, Turner D, Sinnott P, Worthington J, Ollier WE, Hutchinson IV. Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1997 Dec;24(12):2314-7
  164. Nath SK, Harley JB, Lee YH. Polymorphisms of complement receptor 1 and interleukin-10 genes and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Hum Genet.* 2005 Nov;118(2):225-34
  165. Song GG, Choi SJ, Ji JD, Lee YH. Associations between interleukin-10 polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus: A meta-analysis. *Hum Immunol.* 2013 Mar;74(3):364-70.

166. Lin YJ, Wan L, Huang CM, Sheu JJ, Chen SY, Lin TH, Chen DY, Hsueh KC, Lai CC, Tsai FJ. IL-10 and TNF-alpha promoter polymorphisms in susceptibility to systemic lupus erythematosus in Taiwan. *Clin Exp Rheumatol*. 2010 May-Jun;28(3):318-24.
167. Sobkowiak A, Lianeri M, Wudarski M, Łacki JK, Jagodziński PP. Genetic variation in the interleukin-10 gene promoter in Polish patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 2009 Jun;29(8):921-5.
168. Chong WP, Ip WK, Wong WH, Lau CS, Chan TM, Lau YL . Association of interleukin-10 promoter polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*. 2004 Sep;5(6):484-92
169. D'Alfonso S, Giordano M, Mellai M et al. Association tests with systemic lupus erythematosus (SLE) of IL10 markers indicate a direct involvement of a CA repeat in the 50 regulatory region. *Genes Immun* 2002; 3: 454–463
170. Khoa PD, Sugiyama T, Yokochi T. Polymorphism of interleukin-10 promoter and tumor necrosis factor receptor II in Vietnamese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2005 Feb;24(1):11-3
171. Dijkstra HM, Hepkema BG, Kallenberg CG, van der Linden MW, Keijsers V, Huizinga TW, Jansen MD, van de Winkel JG. The R-H polymorphism of FCgamma receptor IIa as a risk factor for systemic lupus erythematosus is independent of single-nucleotide polymorphisms in the interleukin-10 gene promoter. *Arthritis Rheum*. 2002 Apr;46(4):1125-6.
172. Zhou M, Ding L, Peng H, Wang B, Huang F, Xu WD, Li JH, Ye XR, Pan HF, Ye DQ. Association of the interleukin-10 gene polymorphism (-1082A/G) with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Lupus*. 2013;22(2):128-35.
173. Wang B, Zhu JM, Fan YG, Xu WD, Cen H, Pan HF, Ye DQ. Association of the -1082G/A polymorphism in the interleukin-10 gene with systemic lupus erythematosus: A meta-analysis. *Gene*. 2013 Feb 13. pii: S0378-1119(13)00067-X. doi: 10.1016/j.gene.2013.01.026.

174. Fei GZ, Svenungsson E, Frostegård J, Padyukov L. The A-1087IL-10 allele is associated with cardiovascular disease in SLE. *Atherosclerosis*. 2004 Dec;177(2):409-14.
175. Lin PW, Huang CM, Huang CC, Tsai CH, Tsai JJ, Chang CP, Tsai FJ. The association of -627 interleukin-10 promoter polymorphism in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2007 Mar;26(3):298-301.
176. Zhu LJ, Liu ZH, Zeng CH, Chen ZH, Yu C, Li LS. Association of interleukin-10 gene -592 A/C polymorphism with the clinical and pathological diversity of lupus nephritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2005 Nov-Dec;23(6):854-60.
177. Sung YK, Park BL, Shin HD, Kim LH, Kim SY, Bae SC. Interleukin-10 gene polymorphisms are associated with the SLICC/ACR Damage Index in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2006 Apr;45(4):400-4
178. Fife MS, Gutierrez A, Ogilvie EM, Stock CJ, Samuel JM, Thomson W, Mack LF, Lewis CM, Woo P. Novel IL10 gene family associations with systemic juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(5):R148.
179. Möller JC, Paul D, Ganser G, Range U, Gahr M, Kelsch R, Rösen-Wolff A, Hedrich CM. IL10 promoter polymorphisms are associated with systemic onset juvenile idiopathic arthritis (SoJIA). *Clin Exp Rheumatol*. 2010 Nov-Dec;28(6):912-8.
180. Lv C, Wang Y, Wang J, Zhang H, Xu H, Zhang D. Association of Interleukin-10 gene polymorphisms with ankylosing spondylitis. *Clin Invest Med*. 2011 Dec 1;34(6):E370
181. Goedecke V, Crane AM, Jaakkola E, Kaluza W, Laiho K, Weeks DE, Wilson J, Kauppi M, Kaarela K, Tuomilehto J, Wordsworth BP, Brown MA. Interleukin 10 polymorphisms in ankylosing spondylitis. *Genes Immun*. 2003 Jan;4(1):74-6

## 4 ARTIGO ORIGINAL I

### COMBINED EFFECTS OF CXCL8 AND CXCR2 GENE POLYMORPHISMS ON SYSTEMIC SCLEROSIS SUSCEPTIBILITY

**Patricia Hartstein Salim<sup>1</sup>; Mariana Jobim<sup>2</sup>; Markus Bredemeier<sup>3</sup>; José Arthur Bogo Chies<sup>4</sup>; Jeanine Schlottfeldt<sup>2</sup>; João Carlos Tavares Brenol<sup>3</sup>; Luiz Fernando Jobim<sup>5</sup>; Ricardo Machado Xavier<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup>*Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. Brazil.* <sup>2</sup>*Serviço de Imunologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS. Brazil.* <sup>3</sup>*Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS. Brazil.* <sup>4</sup>*Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. Brazil.* <sup>5</sup>*Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. Brazil.*

Supported by FIPE-HCPA, CAPES and CNPq.

Address correspondence and reprint requests to Ricardo M. Xavier, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, 6º andar, sala 630, Rua Ramiro Barcelos 2350, Bairro Bom Fim, CEP 90035-903, Porto Alegre-RS, Brazil. Telephone/Fax: +55 51 2101 8340. E-mail: [rmaxavier@hcpa.ufrgs.br](mailto:rmaxavier@hcpa.ufrgs.br).

*Este artigo foi publicado na revista internacional "Cytokine"*

*Salim PH et al. Combined effects of CXCL8 and CXCR2 gene polymorphisms on susceptibility to systemic sclerosis. Cytokine (2012) Nov;60(2):473-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2012.05.026>*

## ABSTRACT

A previous study suggested that CXCR2 (+1208) TT was related to increased risk for systemic sclerosis (SSc). In the current study, we investigated the influence of genetic variation in CXCL8 and CXCR2 genes in susceptibility to systemic sclerosis. We also combined the variant alleles of these genes to analyze their effects in SSc. Methods: One hundred and fifty-one SSc patients and 147 healthy bone marrow donors were enrolled in a case-control study. Blood was collected for DNA extraction; typing of CXCL8 (-251) T/A and CXCR2 (+1208) T/C genes was made by polymerase chain reaction with sequence specific primers (PCR-SSP), followed by electrophoresis on agarose gel. Results: The frequency of the CXCR2 TC was significantly lower in patients (23.8% versus 55.1% in controls,  $P < 0.001$ ; OR = 0.26, 95%CI: 0.15–0.43) while the frequency of the CXCR2 CC was significantly higher in patients (44.4% versus 22.4 % in controls,  $P < 0.001$ ; OR = 2.76, 95%CI: 1.62-4.72). When CXCR2 and CXCL8 combinations were analyzed, the presence of CXCR2 T in the absence of CXCL8 A (CXCR2 T+/CXCL8 A-) was more frequent in patients than in controls (34.5% versus 3.5%, respectively;  $P < 0.001$ ; OR = 14.50, 95%CI: 5.04-41.40). However, the presence CXCR2 TT and CXCL8 A was more frequent in controls (100%) than in patients (58.3%) ( $P < 0.001$ ). In the same way the presence of CXCR2 TC and CXCL8 A was more frequent in controls (95.1%) than in patients (75%) ( $P = 0.004$ ). Furthermore, the CXCR2 CC genotype in CXCL8 A was more frequent in patients (59.7% versus 0% in controls;  $P < 0.001$ ; adjusted OR=98.67; 95%CI: 6.04-1610.8). In patients, a high frequency was observed in combination with CXCL8 TA and AA genotype ( $P < 0.001$ ; OR=28.92) and, in controls, a high frequency was report in combination with CXCL8 T ( $P < 0.001$ ; OR=0.03) and TT ( $P < 0.001$ ; OR=0.01). Conclusions: Our results propose a protective role of CXCL8 (-251) A in CXCR2 (+1208) TT and TC genotype and suggest an increased risk of CXCL8 (-251) A in CXCR2 (+1208) CC genotype in SSc patients.

## 1. INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is a complex disease that occurs in genetically predisposed individuals who have encountered specific environment exposures and/or other stochastic factors [1]. To date, it is believed that SSc pathogenesis starts from an early inflammatory phase to a progressive fibrosis of the skin and internal organ connective tissues [2], adding together immune disorders suggestive of autoimmunity, which are characterized by the presence of high serum levels of autoantibodies [3].

Emerging data suggest that chemokines may be essential contributors to tissue damage in scleroderma [4]. Chemokine receptors belong to the superfamily of rhodopsin that are coupled to G protein and that its structure is composed of seven transmembrane domains  $\alpha$ -helicoidalais. The term "CXC" comes from the chemokine protein structure, where two amino terminal cysteine residues that participate in disulfide bond are separated by another amino acid [5].

IL-8, a proinflammatory cytokine also known as CXCL8, is found among the CXC subgroup. CXCL8 binds to the receptors CXCR1 and CXCR2. It has several functions, being the primary initiation of chemotaxis, induce angiogenesis, stimulate cell proliferation, induce pain and hypernociception, increase intracellular calcium concentration in neutrophils, monocytes, T lymphocytes, basophils, eosinophils, keratinocytes, induce release of histamine and leukotrienes, stimulate the production of prostaglandin E2 by smooth muscle cells and induce leukocyte migration [6].

Receptor CXCR2 are expressed on neutrophils, have 77% of the amino acid sequence in common and bind to CXCL8 with high affinity [7]. CXCR2 gene is located on 2q35 and there are some polymorphisms that have been widely investigated in studies of diseases association. Among them, the three most investigated are +785 polymorphism (C/T) located in exon 3 (but does not alter the amino acid sequence of protein), and +1208 polymorphisms (T/C) and +1440 (G/A) which are located at the 3' untranslated of the same exon. Polymorphisms in the region 3' untranslated has the ability to alter the processing of mRNA stability and translation [8].

A previous study by Renzoni et al. suggested that the presence of CXCR2 (+1208) TT is associated with SSc and a subgroup analysis discovered that this association is significant both in patients with fibrosing alveolitis or without fibrosing. To confirm these data we designed a study to investigate further the association of CXCR2 and CXCL8 genes with systemic sclerosis [9].

## **2. METHODS**

### **2.1 Patients and controls.**

One hundred and fifty-one patients with systemic sclerosis were prospectively evaluated. All patients met the American College of Rheumatology (ACR) criteria for SSc [10] or the criteria suggested by LeRoy and Medsger for diagnosis of early forms of SSc [11]. All patients were Brazilian; most of them had European and/or African ancestry and lived in the metropolitan area of Porto Alegre/RS. There were neither individuals of Asiatic origin nor Amerindians among the patients. Patients with overlapping syndromes were excluded. However, patients with definite diagnosis of SSc (according to the ACR criteria) who developed

inflammatory myopathy or secondary Sjögren's syndrome were not excluded from the analysis. All patients signed written informed consent before entry in the study.

Controls were 147 voluntary healthy bone marrow donors recruited at the blood bank of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The donors were unrelated subjects of European and/or African ancestry, most of them resident in the urban population of Porto Alegre/RS. Individuals presenting chronic or acute diseases were excluded from the sample, as well as those presenting family history of genetic diseases (X-linked, autosomal or chromosomal abnormalities). Amerindians and subjects with Asiatic origin were not included. All controls signed a written informed consent.

## **2.2 Clinical evaluation.**

All patients were interviewed and examined according to an extensive questionnaire directed to the evaluation of end-organ damage [12]. Disease subtype was classified as follows: diffuse cutaneous SSc (truncal and acral skin tautness), limited cutaneous SSc (skin tautness restricted to extremities and/or face), and limited SSc (sine scleroderma) [11, 13]. Clinical characteristics of the disease were observed and recorded as previously described [12]. Blood samples were collected for serology (antinuclear antibodies – ANA, anticentromere and antitopoisomerase I antibodies) and DNA extraction. Pulmonary high-resolution computed tomography (HRCT) was performed in most patients. Doppler echocardiography was used to estimate the pulmonary systolic arterial pressure (PSAP), and patients with PSAP  $\geq$  40 mmHg were considered to have pulmonary arterial hypertension. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **2.3 Genomic DNA Extraction.**

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using a modified salting out technique, described by Miller SA *et al.* [14].

### **2.4 CXCL8 (-251) T/A and CXCR2 (+1208) C/T genotyping.**

CXCL8 and CXCR2 genes were typed in patients and controls using a Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primers (PCR-SSP) method, as described by Sarvestani *et al.* [15]. As an internal control, the  $\beta$ -globin specific primers were included in the PCR-SSP. For CXCL8 genotyping, 10 $\mu$ l of PCR reaction mixture consisting of 250 ng of genomic DNA, 200 mmol/L dNTPs, 2.25mMMgCl<sub>2</sub>, 1 $\times$  Taq DNA polymerase buffer, 2 units of Taq DNA polymerase, 10 pmol of each test primer and 5 pmol of internal control primers were employed. Then, a touch-down procedure followed that consisted of 25s at 95°C, annealing for 45s at temperatures decreasing from 68°C (4 cycles) to 61°C (20 cycles), and an extension step at 72°C for 40s. The annealing temperature for the remaining 5 cycles was 58°C for 40s. Determination of CXCR2 gene polymorphism was carried out in the same PCR reaction mixture except that the concentration of MgCl<sub>2</sub> was 1.7 mM. In addition, the touchdown procedure was similar to CXCL8 genotyping except that the annealing temperatures in the three consecutive steps were 70, 65, and 55°C, respectively. The reaction products of CXCL8 and CXCR2 gene amplification were separated on 2.5% agarose gel and stained with ethidium bromide.

## 2.5 Statistical Analysis.

Data were analyzed using EPI-INFO version 6.0 and SPSS version 11.0 softwares. Carrier frequencies (CF) for the alleles and its combinations were calculated and given in percent values. The CF were compared using Yates corrected chi-square or Fisher's exact test. Student's t test and Mann-whitney test were used to perform between group comparisons in which the dependent variables were parametric and non-parametric, respectively. Holm's procedure for adjustment of the P values for multiple comparisons was applied (with the aid of the WinPepi Software). The crude and Mantel-Haenszel (M-H; for stratified analysis) odds ratios (OR), along with 95% confidence intervals, were calculated for alleles or combinations whose CF distributions were significantly different between patients and controls. The sample size was calculated with a significance level of 0.05 and a 93.71% of power to detect differences using the WinPepi software.

## 3. RESULTS

The genotype distribution and allele frequencies for the CXCL8 (-251) T/A and CXCR2 (+1208) C/T polymorphisms in systemic sclerosis patients and controls are presented in Table 1. The allele frequencies of CXCL8 and CXCR2 genes were in Hardy-Weinberg equilibrium in both patients and controls. No significant difference was found in the frequencies of CXCL8 (-251) T/A and CXCR2 (+1208) C/T allele.

In our study, we observed a high frequency in systemic sclerosis for carriers of CXCR2 (+1208) CC genotype (44.4% vs 22.4% in controls; OR = 2.76; 95%CI: 1.62-4.72; P < 0.001) and a

low frequency for carriers of CXCR2 (+1208) TC genotype (55.1% vs 23.8% in SSc; OR = 0.26; 95%CI: 0.15-0.43; P < 0.001). The CXCL8 (-251) TT, TA and AA genotype in patients did not differ significantly when compared with control group. Though, we observed a high frequency in controls when we analyzed CXCL8 (-251) T allele in CXCR2 (+1208) CC genotype (100% in controls and 70.1% in SSc; adjusted OR = 0.03; 95%CI: 0.0-0.57; P < 0.001), in Table 2. In the same way, the combination of CXCL8 (-251) TT genotype and CXCR2 (+1208) CC genotype was more frequent in healthy controls than in SSc patients (100% vs 40.3%, respectively; adjusted OR=0.01; 95%CI: 0.0-0.17; P < 0.001).

Furthermore, when we investigate CXCL8 (-251) A allele in CXCR2 (+1208) CC genotype, we found a high frequency in patients compared with controls (59.7% vs 0%, respectively; adjusted OR= 98.67; 95%CI: 6.04-1610.8; P < 0.001). The same was observed in the combination of the CXCL8 (-251) TA and AA with CXCR2 (+1208) CC genotype (29.9% in SSc vs 0% in controls; adjusted OR= 28.92; 95%CI: 1.76-474.8; P < 0.001).

Association of the CXCR2 (+1208) TT genotype with the A allele of the CXCL8 (-251) gene was less frequent in patients than in controls (58,3% vs 100%, respectively; adjusted OR = 0.04; 95%CI: 0.0-0.32; P < 0.001). Similarly, the combination of the CXCL8 (-251) TA genotype and CXCR2 (+1208) TT genotype has a smaller amount in patients than in controls (27.1% vs 54.5%, respectively; OR=0.31; 95%CI: 0.11-0.87; P=0.02). However, the combination of the CXCL8 (-251) TT genotype and CXCR2 (+1208) TT genotype was more frequent in SSc patients than in controls (41.7% vs 0%, respectively; adjusted OR=48.19; 95%CI: 2.91-798.7; P<0.001). Over the most, the presence of CXCR2 +1208 T in the absence of CXCL8 -251 A (CXCR2 T+/CXCL8 A-) was more

frequent in patients than in controls (34.5% versus 3.5%, respectively;  $P < 0.001$ ; OR = 14.50, 95%CI 5.04-41.40). No significant differences was found in the combination of CXCL8 (-251) AA genotype and CXCL8 (-251) T allele with CXCR2 (+1208) TT genotype.

By analyzing CXCL8 (-251) A allele in CXCR2 (+1208) TC genotype we found a high frequency in controls when evaluate patients and controls (75.0% and 95.1%, respectively; OR =0.16; 95%CI: 0.03-0.63;  $P = 0.004$ ). Besides, the combination of CXCL8 (-251) TT genotype and CXCR2 (+1208) TC genotype was more frequent in SSc patients than in controls (25% vs 4.9%, respectively; OR=6.42; 95%CI: 1.6-30.3;  $P=0.003$ ). No association was observed in CXCL8 (-251) T / TT / AA genotype in the combination of CXCR2 (+1208) TC genotype.

When clinical and laboratory data of the SSc patients were compared, no significant differences in the CXCL8 (-251) and CXCR2 (+1208) gene frequencies were found with regard to the severity of skin disease, disease subtype, pulmonary interstitial and vascular involvement and autoantibody profile.

#### **4. DISCUSSION**

The approximately 50 human chemokines are grouped into 4 families on the basis of conserved cysteine residues near their amino terminus, and are designated CC, CXC, C, and CX3C subfamilies. The CXC chemokine ligands are further subdivided on the basis of the presence or absence of another 3 amino acid sequence, glutamic acid-leucinearginine (the "ELR" motif), immediately proximal to the CXC sequence. [16]. The ELR-positive CXC chemokines, which include interleukin (IL)-8/CXCL8, are potent neutrophil chemoattractants.

The chemokine-receptor binding initiates a complex signaling cascade that generates chemotactic responses, degranulation, release of ROS and alteration in the affinity of integrins present on cell surface. [17]. CXCR1 and CXCR2 are both expressed by endothelial cells, but only the expression of CXCR2 is required for endothelial cell chemotaxis [18]. When the function of CXCR2 is blocked, the response of endothelial cells to CXCL8 is abrogated [19].

The importance of CXCL8 receptors for the migration of neutrophils was demonstrated in a study with knockout mice of the homologous receptors CXCR1 and CXCR2, in other words that do not express such proteins. In these animals, neutrophils failed to cross the epithelium and accumulate in the subepithelial tissue [20]. In addition, an overexpression of CXCR2 was considered an important factor in inflammatory diseases like rheumatoid arthritis, atherosclerosis and psoriasis [21].

Polymorphism +1208 (T / C) of the CXCR2 gene was investigated as a factor in susceptibility to the development of multiple sclerosis in Iranian individuals, but found no significant association [22]. When evaluated for Behcet's disease, the polymorphisms +785 (C / T) and +1208 (T / C) also showed no positive association [23, 24]. A similar result was obtained by Breunis et al. [25], where there was no relationship between polymorphisms +1208 (T / C) and +1440 (G / A) with Kawasaki disease. It should be noted that children who suffer from this disease have very high levels of proinflammatory cytokines and chemokines such as CXCL8 [26].

However, for diseases such as fibrosing alveolitis associated with systemic sclerosis, CXCR2 gene polymorphisms appear to be important, because there was a significant increase in the frequency of individuals with genotypes +785 CC and +1208 TT in a group with this disease

[9]. When the polymorphism +785 (C / T) was evaluated in respiratory diseases, the presence of the T allele was considered as a possible protective factor against pulmonary inflammation [27]. A similar protective effect was observed in relation to polymorphisms +1208 (T / C) and +1440 (G / A), and the presence of diplotype 1208T/1440G represented a decreased risk of development of Classic Kaposi's sarcoma (OR = 0.49, 95% CI: 0.30 - 0.78) [28].

Several polymorphisms in a given individual may contribute to the individual risk of developing the disease. In our study, the presence of CXCR2 T allele in the absence of CXCL8 A allele (CXCR2 T+/CXCL8 A-) was more frequent in patients than in controls (OR = 14.50), suggesting an increased risk for the disease. By the way, otherwise is truth. The CXCL8 (-251) A allele and TA genotype in combination with CXCR2 (+1208) TT genotype has a higher frequency in healthy controls (OR=0.04 and OR=0.31, respectively), suggesting a protective effect. Conversely, CXCL8 (-251) TT genotype in association with CXCR2 (+1208) TT genotype has an elevated frequency in SSc patients and suggest a higher risk for disease (OR=48.19).

The CXCR2 (+1208) T/C has the potential of altering mRNA processing, stability or translation and is located in the 3' untranslated region of exon 3 [8]. A previous study by Renzoni et al. [9] report an association of the presence of CXCR2 +1208 T allele with SSc (OR=1.63). They also found that the association with SSc was greater when this allele is homozygous (OR=2.67). These findings were not confirmed in our study. We found a significantly risk for systemic sclerosis for carriers of CXCR2 (+1208) CC genotype (OR=2.76) and a protective effect for carriers of CXCR2 (+1208) TC genotype (OR=0.26). In addition, we observed a significantly higher risk in CXCR2 (+1208) CC genotype with CXCL8 (-251) A allele

(OR=98.67) and the same was observed in the combination with CXCL8 (-251) TA genotype (OR=28.92) and CXCL8 (-251) AA genotype (OR=28.92). In opposition, CXCL8 (-251) T allele and TT genotype in combination with CXCR2 (+1208) CC was more frequent in healthy controls, suggesting a protective effect (OR=0.03 and OR=0.01, respectively). Moreover, association of the CXCR2 (+1208) TC genotype with CXCL8 (-251) A allele was more frequent in healthy controls (OR=0.16) and the association with CXCL8 (-251) TT genotype was more frequent in SSc patients (OR=6.42). Besides, it is necessary to increase the understanding of how these genetic polymorphisms relate to the development of SSc.

Renzoni et al. [9] strongly suggests a role for CXCR2 polymorphisms in the pathogenesis of this disease. This study described the association of CXCR2 and SSc in the United Kingdom population, indicating that the homozygous TT is a risk factor for the disease. Our study did not find this result. We found that the homozygous CC may be a risk factor. It is known that the Brazilian population has a high diversity, pointing out differences and similarities between the people of various regions and other Nations. Inter-marriage between the Portuguese and indigenous people or slaves was common in the first centuries of colonization. While historically the major European ethnic group in Brazil was Portuguese, the subsequent waves of immigration have also contributed to the establishment of a multi-ethnic population (Parra et al., 2003). It would be a plausible explanation for the difference. Anyway, we evaluated the interaction between CXCL8 and its receptor, CXCR2. The study by Renzoni et al. [9] not has done these tests in order to compare them.

To date, no study described the association of the CXCL8 (-251) promoter gene in patients with SSc and only Renzoni et al. [9] investigate the relationship of the CXCR2 (+1208) with SSc patients. In conclusion, we suggest that CXCR2 (+1208) in association with CXCL8 (-251) may play a role in the pathogenesis of this disease. The presence of A allele (CXCL8) with T allele (CXCR2) may contribute to protect from SSc and his absence increases the risk of the disease. Within the C allele of the CXCR2 the same happens in reverse, the presence of the A allele of the CXCL8 increases the risk of the disease and his absence protect from SSc. Additional studies enrolling other ethnically diverse populations must be performed to ascertain whether this gene could be a marker for SSc. Also, other studies investigating the functionality of the CXCR2 and CXCL8 polymorphisms will be necessary to better understand the results of the association-disease studies.

## References

1. Agarwal SK, Tan FK, Arnett FC. Genetics and genomic studies in scleroderma (systemic sclerosis). *Rheum Dis Clin North Am.* 34 (2008) 17–40.
2. Arnett FC. Is scleroderma an autoantibody mediated disease? *Curr Opin Rheumatol* 18:6 (2006) 579–581.
3. Andrade, LEC and Leser, PG. Autoantibody in the Systemic Sclerosis. *Rev Bras Reumatol.* 44:3 (2004) 215-223.
4. Atamas SP and White B. The role of chemokines in the pathogenesis of scleroderma *Curr Opin Rheumatol.* 15 (2003) 772–777.
5. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 12 (2000) 121-127.

6. Morris SW, Nelson N, Valentine MB, Shapiro DN, Look AT, Kozlosky CJ, et al. Assignment of the genes encoding human interleukin-8 receptor types 1 and 2 and an interleukin-8 receptor pseudogene to chromosome 2q35. *Genomics* 14 (1992) 685–691.
7. Lee J, Horuk R, Rice GC, Bennett GL, Camerato T and Wood WI. Characterization of two high affinity human interleukin-8 receptors. *J Biol Chem.* 267 (1992) 16283-16287.
8. Sprenger H, Lloyd AR, Lautens LL, Bonner TI and Kelvin DJ. Structure, genomic organization, and expression of the human interleukin-8 receptor B gene. *J Biol Chem.* 269 (1994) 11065-11072.
9. Renzoni E, Lympny P, Sestini P, Pantelidis P, Wells A, Black C, et al. Distribution of novel polymorphisms of the interleukin-8 and CXC receptor 1 and 2 genes in systemic sclerosis and cytogenic fibrosing alveolitis. *Arthr Rheum.* 43 (2000) 1633-1640.
10. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Committee. *Arthritis Rheum.* 23 (1980) 581-590.
11. LeRoy EC and Medsger TA Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 28 (2001) 1573-1576.
12. Bredemeier M, Xavier RM, Capobianco KG, Restelli VG, Rohde LE, Pinotti AF, et al. Nailfold capillary microscopy can suggest pulmonary disease activity in systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 31 (2004) 286-294.
13. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA Jr, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol.* 15 (1988) 202-205.
14. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 1215.
15. Sarvestani, EK; Nikseresht, AR; Aliparasti, MR and Vessal, M. IL-8 (-251 A/T) and CXCR2 (+1208 C/T) gene polymorphisms and risk of multiple sclerosis in Iranian patients. *Neuroscience Letters* 404 (2006) 159–162.
16. Murdoch C, Monk PN and Finn A. Cxc chemokine receptor expression on human endothelial cells. *Cytokine.* 11 (1999) 704 –712.
17. Cruvinel, WM; Mesquita Júnior, D; Araújo, JAP; Catelan, TTT; Souza, AWS; Silva, NP, et al. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Braz J Rheumatol.* 50 (2010) 434-436.
18. Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, Liu H, Ehlert JE, Xue YY, et al. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol.* 165 (2000) 5269 –5277.

19. Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, Rafiee P, Maaser C, Gockel HR, et al. Angiogenic effects of IL 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J Biol Chem.* 278 (2003) 8508 – 8515.
20. Hang L, Frendeus B, Godaly G and Svanborg C. Interleukin-8 receptor knockout mice have subepithelial neutrophil entrapment and renal scarring following acute pyelonephritis. *J Infect Dis.* 182 (2000) 1738–1748.
21. Kulke R, Bornscheuer E, Schluter C, Bartels J, Rowert J, Sticherling M, et al. The CXC receptor 2 is overexpressed in psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol.* 110 (1998) 90–94.
22. Kamali-Sarvestani E, Nikseresht AR, Aliparasti MR and Vessal M. IL-8 (-251 A/T) and CXCR2 (+1208 C/T) gene polymorphisms and risk of multiple sclerosis in Iranian patients. *Neurosci Lett.* 404 (2006) 159-162.
23. Duymaz-Tozgir J, Yilmaz V, Uyar FA, Hajeer AH, Saruhan-Direskeneli G and Gul A. Polymorphisms of the IL-8 and CXCR2 genes are not associated with Behçet's disease. *J Rheumatol.* 32 (2005) 93–97.
24. Lee EB, Kim JY, Zhao J, Park MH and Song YW. Haplotype association of IL-8 gene with Behçet's disease. *Tissue Antigens.* 69 (2006) 128-132.
25. Breunis WB, Biezeveld MH, Geissler J, Kuipers IM, Lam J, Ottenkamp J, et al. Polymorphisms in chemokine receptor genes and susceptibility to Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol.* 150 (2007) 83-90.
26. Lin CY, Lin CC, Hwang B and Chiang B. Serial changes of serum interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha among patients with Kawasaki disease. *J Pediatr.* 121 (1992) 924-926.
27. Matheson MC, Ellis JA, Raven J, Walters EH and Abramson MJ. Association of IL8, CXCR2 and TNF polymorphisms and airway disease. *J Hum Genet.* 51 (2006) 196-203.
28. Brown EE, Fallin D, Ruczinski I, Hutchinson A, Saats B and Vitale F. Associations of classic Kaposi sarcoma with common variants in genes that modulate host immunity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15 (2006) 928-934.

## Tables

**Table 1.** Alleles and Genotype Distribution of the CXCR2 and CXCL8 Single-Nucleotide Polymorphisms in the Systemic sclerosis (151) and healthy controls (147).

	Healthy Control		Systemic Sclerosis		P-value*
	n	%	n	%	
<b>CXCR2 (+1208)</b>					
T	147	50.0	132	43.7	NS
C	147	50.0	170	56.3	NS
TT	33	22.4	48	31.8	<0.001
TC	81	55.1	36	23.8	
CC	33	22.4	67	44.4	
<b>CXCL8 (-251)</b>					
T	146	49.7	167	55.3	NS
A	148	50.3	135	44.7	NS
TT	37	25.2	56	37.1	NS
TA	72	49.0	55	36.4	
AA	38	25.9	40	26.5	

\*P-values of alleles were calculated by Fischer's exact test and genotypes by chi-squared test.

**Table 2.** Correlation between CXCR2 and CXCL8 in healthy controls (147) and Systemic Sclerosis (151).

	Healthy Control		Systemic Sclerosis		P-value
	n	%	n	%	
<b>CXCR2 TT</b>					
CXCL8 T +	18	54.5	33	68.8	NS
CXCL8 A +	33	100.0	28	58.3	<0.001
CXCL8 TT	0	0.0	20	41.7	
CXCL8 TA	18	54.5	13	27.1	<0.001
CXCL8 AA	15	45.5	15	31.3	
<b>CXCR2 TC</b>					
CXCL8 T +	58	71.6	31	86.1	NS
CXCL8 A +	77	95.1	27	75.0	0.004
CXCL8 TT	4	4.9	9	25.0	
CXCL8 TA	54	66.7	22	61.1	0.003
CXCL8 AA	23	28.4	5	13.9	
<b>CXCR2 CC</b>					
CXCL8 T +	33	100.0	47	70.1	<0.001
CXCL8 A +	0	0.0	40	59.7	<0.001
CXCL8 TT	33	100.0	27	40.3	
CXCL8 TA	0	0.0	20	29.9	<0.001
CXCL8 AA	0	0.0	20	29.9	

\*Chi-Square Test or Fischer's Exact Test

## 5 ARTIGO ORIGINAL II

### INTERLEUKIN-10 GENE AND NFKB1 PROMOTER INSERTION/DELETION POLYMORPHISMS IN SYSTEMIC SCLEROSIS

**Patricia Hartstein Salim<sup>1</sup>; Mariana Jobim<sup>2</sup>; Markus Bredemeier<sup>3</sup>; José Arthur Bogo Chies<sup>4</sup>; Jeanine Schlottfeldt<sup>2</sup>; João Carlos Tavares Brenol<sup>3</sup>; Luiz Fernando Jobim<sup>5</sup>; Ricardo Machado Xavier<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup>*Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. Brazil.* <sup>2</sup>*Serviço de Imunologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS. Brazil.* <sup>3</sup>*Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS. Brazil.* <sup>4</sup>*Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. Brazil.* <sup>5</sup>*Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. Brazil.*

Supported by FIPE-HCPA, CAPES and CNPq.

Address correspondence and reprint requests to Ricardo M. Xavier, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, 6º andar, sala 630, Rua Ramiro Barcelos 2350, Bairro Bom Fim, CEP 90035-903, Porto Alegre-RS, Brazil. Telephone/Fax: +55 51 2101 8340. E-mail: [rmaxavier@hcpa.ufrgs.br](mailto:rmaxavier@hcpa.ufrgs.br) and [psalim@hcpa.ufrgs.br](mailto:psalim@hcpa.ufrgs.br)

*Este artigo foi publicado na revista "Scandinavian Journal of Immunology"*

*Salim PH et al. Interleukin-10 Gene Promoter and NFKB1 Promoter Insertion/Deletion Polymorphisms in Systemic Sclerosis. Scand J Immunol. 2013 Feb; 77(2):1628. doi:10.1111/sji.12020.*

**ABSTRACT**

Systemic sclerosis (SSc) is a connective tissue disease characterized by fibrotic, immunological, and vascular abnormalities. Nuclear factor- $\kappa$ B (NFKB), as a key transcription factor involved in the regulation of immune responses, appears to be a good candidate for studies on the pathogenesis of autoimmune diseases, as well as the Interleukin-10 (IL-10) polymorphism, which other studies have suggested an association with SSc. Our objective was to study the association of NFKB and IL-10 gene polymorphisms with SSc. One hundred and fifty-one SSc patients and 147 healthy bone marrow donors were enrolled in a case-control study. Blood was collected for DNA extraction; typing of IL-10 genes was made by polymerase chain reaction with sequence specific primers (PCR-SSP) and NFKB gene typing was made by restriction fragment length polymorphism (RFLP). Patients underwent clinical evaluation, serology, Doppler echocardiography and chest high-resolution computed tomography. The frequency of IL-10 (-1082) GG genotype was found to be significantly higher in SSc patients (36.4%) as compared to healthy controls (22.4%) ( $P=0.012$ ). The frequency of heterozygous genotype GA was significantly lower ( $P=0.004$ ) in patients (38.4%) in comparison to control subjects (55.8%). A predominance of the high-producing IL-10 phenotype (GCC+/GCC+) was observed in SSc patients compared with healthy controls (37,7% vs 24,5%, respectively; OR: 1.87, 95% CI: 1.10-3.19,  $P=0.019$ ). No significant difference was found in the allelic and genotype distribution of the NFKB promoter polymorphism between patients and controls. No statistically significant associations were found between IL-10 or NFKB polymorphisms clinical and laboratory features of SSc. Our results confirmed the association of the high-producing phenotype (GCC+/GCC+) with increased risk for SSc, but found no correlation with NFKB polymorphisms.

## INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is a chronic, multisystem connective tissue disorder affecting the skin and internal organs, and characterized by widespread microangiopathy, fibrosis, and autoimmunity. The complex pathophysiology of SSc involves genetic and environmental factors [1]. Extra cellular matrix (ECM) production by fibroblasts in SSc is modulated by cytokines [2]. Interleukin 10 (IL-10) is an anti-inflammatory cytokine secreted by monocytes and lymphocytes. As well as having anti-inflammatory properties, in vitro it inhibits collagen production and secretion from both normal and SSc fibroblasts [3].

IL-10 gene is located on chromosome 1 at 1q31-q32 and several single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been described in the promoter region [4]. The most widely characterized are the three polymorphisms located in the distal 1.3–4 kb (T/A -3575, G/A -2849 and C/A -2763) and the three polymorphisms located in the proximal 1.3 kb (G/A-1082, C/T-819, C/A -592) [5].

Polymorphisms in the putative promoter region of the human IL-10 gene were identified and correlated to high or low IL-10 production of peripheral blood cells (PBCs) upon in vitro stimulation with lipopolysaccharide (LPS) [6]. Likewise, studies have been presented providing evidence for associations between these IL-10 promoter variants and infectious or autoimmune diseases. A previous study suggested that IL-10 (-1082) G/A alleles or haplotypes containing these alleles may play role in SSc susceptibility [7]. On the other hand, another study showed that diffuse SSc patients were less likely to carry the genotype indicative of high IL-10

production when compared with controls [8]. Moreover, the GCC haplotype is overrepresented in patients with SSc [9].

In addition to the cells and interleukins, other factors seem to be associated with SSc. Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), as a key transcription factor involved in the regulation of immune responses and apoptosis, appears to be a good candidate for studies on the pathogenesis of autoimmunity [10]. Several polymorphisms have been recently identified such as a polymorphism in the promoter region of nuclear factor- $\kappa$ B1 (NFKB1) gene, which is a 4 base pair (bp) insertion/deletion (-94ins/delATTG) [11]. NFKB1 gene mapped on 4q23-q24, is composed of 24 exons and introns which encode p105 and p50 proteins (p105 is a non-DNA-binding cytoplasmic molecule and p50 is a DNA-binding protein corresponding to the N-terminus of p105) [12].

So far no study has examined the association of the NFKB1 gene polymorphism with SSc. In Rheumatoid Arthritis, both in vitro and in vivo studies indicate an important role of NF- $\kappa$ B signaling in the development and progress of the disease [13]. However, case-control studies performed in different populations failed to replicate the association of the NFKB1 polymorphism with rheumatoid arthritis (AR), systemic lupus erythematosus (SLE) and ankylosing spondylitis (AS) [14,15].

The aim of our study was to investigate whether the polymorphism in the promoter region of the NFKB1 gene (-94ins/delATTG) and interleukin-10 gene (-1082 G/A, -819 T/C and -592 A/C) were associated with the risk for systemic sclerosis in southern Brazilian patients, and whether these polymorphisms are associated with clinical manifestations.

## METHODS

**Patients and controls.** One hundred and fifty-one patients with systemic sclerosis were prospectively evaluated. All patients met the American College of Rheumatology (ACR) criteria for SSc [16] or the criteria suggested by LeRoy and Medsger for diagnosis of early forms of SSc [17]. All patients were Brazilian; most of them had European and/or African ancestry and lived in the metropolitan area of Porto Alegre/RS. There were neither individuals of Asiatic origin nor Amerindians among the patients. Patients with overlapping syndromes were excluded. However, patients with definite diagnosis of SSc (according to the ACR criteria) who developed inflammatory myopathy or secondary Sjögren's syndrome were not excluded from the analysis. All patients signed written informed consent before entry in the study.

Controls were 147 voluntary healthy bone marrow donors recruited at the blood bank of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The donors were unrelated subjects of European and/or African ancestry, most of them resident in the urban area of Porto Alegre/RS. Individuals presenting chronic or acute diseases were excluded from the sample, as well as those presenting family history of genetic diseases (X-linked, autosomal or chromosomal abnormalities). Amerindians and subjects of Asiatic origin were not included. All controls signed a written informed consent.

**Clinical evaluation.** All patients were interviewed and examined according to an extensive questionnaire directed to the evaluation of end-organ damage [18]. Disease subtype was classified as follows: diffuse cutaneous SSc (truncal and acral skin tautness), limited cutaneous SSc (skin tautness restricted to extremities and/or face), and limited SSc (sine

scleroderma) [17, 19.]. Clinical characteristics of the disease were observed and recorded as previously described [18]. Blood samples were collected for serology (antinuclear antibodies – ANA, anticentromere and antitopoisomerase I antibodies) and DNA extraction. Pulmonary high-resolution computed tomography (HRCT) was performed in most patients. Doppler echocardiography was used to estimate the pulmonary systolic arterial pressure (PSAP), and patients with PSAP  $\geq$  40 mmHg were considered to have pulmonary arterial hypertension. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

**Genomic DNA Extraction.** Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using a modified salting out technique, described by Miller SA et al. [20]. Briefly, 10 ml of blood was mixed with triton lysis buffer (0.32 M sucrose, 1% Triton X-100, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5). Leukocytes were spun down and washed with H<sub>2</sub>O. The pellet was incubated with proteinase K at 56°C and subsequently salted out at 4°C using a substrate NaCl solution. Precipitated proteins were removed by centrifugation. The DNA in supernatant fluid was precipitated with ethanol. The DNA pellet was dissolved in 400  $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

**IL-10 gene polymorphisms.** Interleukin-10 (–592C/A), (–819C/T) and (–1082A/G) promoter genes were typed in patients and controls using a Polymerase Chain Reaction with Sequence Specific Primers (PCR-SSP) method, as described by Atan et al. [21]. As an internal control, the  $\beta$ -globin specific primers were included in the PCR-SSP (5'-TGCCAAGTGGAGCACCCAA-3' and 5'-GCATCTTGCTCTGTGCAGAT-3'). PCR reaction mixtures (25  $\mu$ l) contained 1  $\mu$ l PCR buffer, 200 mM each dNTP, 1 mM of each primer (forward and reverse

control and allele-specific), 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 50ng of genomic DNA, 0.5 U polymerase (AmpliTaq Gold DNA polymerase; Applied Biosystems) and 0.2 mM of each internal control primers. For Interleukin-10 (-592C/A), the following PCR protocol was used: 5 min initial denaturation at 94°C, 30 cycles of 94°C, 68°C and 72°C for 1min each, followed by a final extension stage of 72°C for 5 min. For Interleukin-10 (-819C/T) was used 65°C and for Interleukin-10 (-1082A/G) was used 63°C. PCR products were stained with ethidium bromide and visualized on 2% agarose gels electrophoresed for 20 min at 200 V.

**Genotyping of NFKB1 polymorphism.** A genomic DNA sequence of 289 bp upstream of the NFKB1 gene was amplified using polymerase chain reaction with restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), as described by Lewander et al. [22]. PCR reaction mixtures (20 µl) contained 50 ng of genomic DNA, 1x PCR buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM dNTP, 0.5 mM of each primer and 0.5 U Taq-polymerase (SDS Bioscience). The sequence of the forward primer was 5'-TTTAATCTGTGAAGAGATGTGAATG-3' and the reverse primer was 5'-CTCTGGCTTCCTAGCAGGG-3'. The PCR condition was 95°C for 5 min (initial denaturation), 95°C for 30s (denaturation), 58°C for 30s (annealing), 72°C for 30s (extension). The total number of cycles was 35 followed by a final extension of 72°C for 5 min. The PCR product was stored at 8°C until restriction enzyme cleavage. We used PflM I and a cleavage protocol following the manufacturer's instructions. For homozygote insertion or wild-type (WW), there were two restriction sites generating three fragments of the PCR product, 206 bp, 48 bp, and 35 bp. For homozygote deletion (DD), there was one restriction generating two fragments, 254 bp and 35 bp. For heterozygote deletion (WD), there were four fragments, 254 bp, 206 bp, 48 bp, and 35 bp. The deletion allele (254 bp) was easily distinguishable from the wildtype allele (206 bp) after separation in a 3% agarose gel.

**Statistical Analysis.** Data were analyzed using EPI-INFO version 6.0. Carrier frequencies (CF) for the alleles and its combinations were calculated and given in percent values. The CF were compared using Yates corrected chi-square or Fisher's exact test. Student's t test and Mann-whitney test were used to perform between group comparisons in which the dependent variables were parametric and non-parametric, respectively. The crude odds ratios (OR), along with 95% confidence intervals (95%CI), were calculated for alleles or combinations whose CF distributions were significantly different between patients and controls. The sample size was calculated, using the WinPepi software, for a significance level of 0.05 and a statistical power of 90.52%.

## RESULTS

***Interleukin-10 (-1082/-819/-592) allele and genotype polymorphisms.*** The frequencies of the alleles and genotype of IL-10 promoter (-1082/-819/-592) in patients and controls are summarized in Table 1. Allele and genotype distributions had no deviation from Hardy-Weinberg equilibrium both in SSc patients and control subjects. The frequency of (-1082) GG genotype was found to be significantly higher (OR=1.86, 95%CI: 1.12-3.11, P=0.012) in SSc patients as compared to healthy controls. The frequency of heterozygous genotype GA was significantly lower (OR=0.049, 95%CI: 0.31-0.78, P=0.004) in patients. No significant difference in the frequency of homozygous AA genotype was observed between SSc patients and healthy controls.

The genotype CT of IL-10 (-819) SNP was the most frequently observed genotype in both patients and controls (64.2% and 51.7%, respectively). Chi-square analysis was performed to

compare IL-10 (-819) SNP genotype distribution in patient and control groups, and it was found that genotype distribution was significantly different in the two groups ( $P=0.005$ ), but only CC genotype was found to be associated with a protection factor (OR: 0.39, 95CI%: 0.21-0.69,  $P=0.002$ ).

Analyzing the genotype IL-10 (-592), we found a slight difference between SSc patients and healthy controls ( $P=0.022$ ). A significantly higher risk for systemic sclerosis was observed for carriers of IL-10 (-592) CC genotype (OR: 1.96; 95%CI: 1.21-3.19,  $P=0.009$ ). No difference was found in genotype CA and AA when compared SSc patients with healthy controls.

***Interleukin-10 haplotype and phenotype distribution in SSc patients.*** The distribution of the proximal IL-10 haplotypes and phenotypes, as defined on the basis of previously published data (22), is reported in Table 2. A relative predominance of the high-producing phenotype (corresponding to the GCC/GCC genotype) was observed in SSc patients compared with healthy controls (36.4% vs 22.4%; OR: 1.87; CI95%: 1.10-3.19,  $P=0.019$ ). No significant difference was found when analyzing medium-producing phenotype (corresponding to the GCC/ACC and GCC/ATA) and low-producing phenotype (corresponding to the ACC/ ACC, ACC/ATA or ATA/ATA genotypes). Likewise, when we analyzed the haplotypes of the interleukin-10, we found no association with SSc and healthy controls.

***NFKB1 (-94ins/delATTG) Promoter Polymorphism.*** The allele and genotype frequencies of the NFKB1 (-94ins/delATTG) promoter polymorphism in SSc patients as well as in the controls are shown in Table 1. The allele frequencies of NFKB1 gene were in Hardy-Weinberg equilibrium in both patients and controls. No significant difference was found in the allelic distribution of

the -94ins/delATTG NFKB1 promoter polymorphism when patients and controls were compared. Likewise, no difference between SSc patients and healthy controls was found in the distributions of the genotypes.

***Interaction of NFKB1 (-94ins/delATTG) Promoter Polymorphism with Interleukin-10 Genotypes and Association with SSc.*** The relation of NFKB1 promoter polymorphism with IL-10 genotypes in patients with SSc and controls are shown in Table 3. Among patients homozygotic for the wild type of the NFKB1 polymorphism, the CC genotype of the IL-10 (-819) presented a lower frequency in patients than in controls (OR=0.19, 95CI%: 0.05-0.64, P=0.005). Among heterozygotic patients for the -94ins/delATTG NFKB1 promoter polymorphism, we found a higher frequency of the genotype CC of the IL-10 (-592) in patients than in healthy controls (OR=3.31, 95%CI: 1.31-8.75, P=0.01).

***Distribution of IL-10 polymorphisms and NFKB1 promoter gene in relation to laboratory characteristics in SSc patients.*** When clinical and laboratory data of the SSc patients were compared across the different genotypic profiles of the promoter region of the NFKB1 gene and the Interleukin-10 genes, no significant differences were found with regard to the severity of skin disease, disease subtype, pulmonary interstitial and vascular involvement and autoantibody profile.

## **DISCUSSION**

In our study, we investigated three polymorphisms of IL-10 and the distribution of the proximal IL-10 haplotypes and phenotypes in systemic sclerosis and observed a relative

predominance of the high-producing phenotype (GCC/GCC genotype) in these patients. We also report for the first time an analysis of NF- $\kappa$ B polymorphism in SSc, but no association was found. The main limitations of this study are the small sample size, which could explain the inability to observe an association with NFKB.

Three single base pair substitutions in the region of the IL-10 gene (G/A -1082, C/T -819 and C/A -592) influence the amount of IL-10 secreted in cell cultures. The GCC/GCC genotype is more common in those who produce higher IL-10 levels in whole blood cultures while the ATA/ATA genotype predominates in the lower IL-10 producers [23]. The -1082 SNP was found to be the major contributor to IL-10 production [5], and the GG homozygosis at position -1082 is indeed associated with an increased secretion of this cytokine in vitro [24]. A recent meta-analysis was conducted to determine whether IL-10 gene polymorphisms are associated with SSc. The study analyzed three gene polymorphisms, including IL-10 -1082G/A, IL-10 -819C/T and IL-10 -3575T/A in a total of eight studies involving 1,034 SSc cases and 1,815 controls obtained by electronic database. They found that IL-10 819C allele might contribute to SSc susceptibility and there was no evidence of statistically significant association between IL-10 1082G/A polymorphism and SSc. [25]

In an Italian cohort of scleroderma patients, proximal IL-10 haplotypes are differently distributed between controls and SSc patients. The researchers observed that the GCC haplotype (high-producing) increases the likelihood of presenting the diffuse SSc subset of the disease, while the low-producing haplotype is protective [9]. In our study, high-producing phenotype (GCC+/GCC+) were more frequent in SSc patients when compared with healthy

controls ( $P=0.019$ ), suggesting an increased risk for the disease. Our results also shown a significantly higher frequency of (-1082) GG genotype in SSc patients compared with healthy controls ( $OR=1,86$ ), while IL-10 (-1082) GA genotype was protective factor for SSc ( $OR=0.49$ ). Ates et al. found a higher frequency of (-1082) G allele in SSc patients than in control. In the same way, the frequency of the GCC haplotype was higher in patients when compared to healthy controls, suggesting that IL-10 1082 G/A alleles or haplotypes containing these alleles may play role in SSc susceptibility [7].

In SLE, a study suggests that the IL-10 locus contributes to the genetic background important for the development of the disease [26]. Although it is suggested that IL-10 production is under strong genetic influences, the association of IL-10 allele and/or haplotype with level of IL-10 is still a controversy in some studies. In the same way, other genes are being studied to better understand the disease mechanism. A study of the NFKB1 polymorphism with SLE patients in the Chinese population has shown that heterozygote deletion of ATTG (WD genotype) was associated with a significantly decreased risk of disease ( $P=0.012$ ) [27]. However, another study in a Spanish population failed to replicate the association of the NFKB1 polymorphism with SLE [14].

NF- $\kappa$ B is an important transcription factor that plays an essential role in the regulation of the immune response and autoimmune diseases. It is required for lymphocyte activation, proliferation, and expression of various cytokines. A previous study report that increased CD8 T cell apoptosis in systemic sclerosis is associated with low levels of NF- $\kappa$ B [28]. It is possible that

the NF- $\kappa$ B reduction in SSc CD8<sup>+</sup> T cells occurs because NF- $\kappa$ B is usually activated by stimuli such as cytokines, oxidants, viruses, lipopolysaccharide, and ultraviolet radiation.

Many dimeric forms of NF- $\kappa$ B have been detected, but the major form is a heterodimer of the p50 and p52 subunits, encoded by the genes NFKB1 and NFKB2, respectively [26]. The physiological function of NFKB1 in immunity was initially investigated by generation and analysis of *nfkb1*<sup>-/-</sup> mice. These mice display no histopathological changes, but have multifocal defects in immune system function [29]. The promoter region of NFKB1 gene has a deletion of 4 base pair (ATTG) located between two putative key promoter regulatory elements, AP-1 and  $\kappa$ B [11]. This polymorphism has been shown to decrease NFKB1 transcriptional activity probably by interfering with binding sites for some crucial transcription factors [30].

In rheumatoid arthritis (RA) patients [14], as well as in ankylosing spondylitis (AS) patients [15], no association was found with the NFKB1 polymorphism, but a genetic interaction was found between NFKB1 and FCRL3 in Spanish patients with RA [31]. A meta-analysis suggests an association between NFKB1 to certain autoimmune and inflammatory diseases in the Asian population, but not in the Caucasian population [32]. Likewise, our study found no association of NFKB1 polymorphism with SSc. These observations may be explained by the fact that the populations are genetically different.

Recently a study suggested that the cytokine synthesis inhibitory activity of IL-10 may be mediated by the inhibition of NF- $\kappa$ B activation in activated human monocytes [33]. As the functional interaction between NF- $\kappa$ B and IL-10 has been demonstrated, we decided to investigate whether any genotype combination showed an altered pattern when SSc patients

were compared with controls. We found a statistically significant association between IL-10 (-819) CC and systemic sclerosis among NFKB1 WW individuals, suggesting a protective effect in individuals heterozygous for the ATTG insertion with the homozygous CC allele of IL-10 (OR=0.19). Furthermore, we reported an association between IL-10 (-592) CC and increased risk for SSC in NFKB1 WD individuals.

Several lines of evidence indicate that SSc presents deregulated production of cytokines implicated in vascular damage and fibrosis, but their relationship with clinical findings is still unclear. IL-10 is a plausible candidate gene to study in the pathogenesis of SSc, not only because of its anti-inflammatory properties, but also because it protects against fibrosis [34]. In the same way, the NFKB1 gene is itself up-regulated by NF- $\kappa$ B, which may be important for negative-feedback regulation of signaling pathways dependent on induced p105 proteolysis [35], given that NF- $\kappa$ B induction is essential for the expression of a wide variety of immune-response genes [36]. Deregulation of NF- $\kappa$ B can lead to the constitutive overproduction of pro-inflammatory cytokines, which is associated with a number of chronic inflammatory disorders [37, 38].

Following the identification of possible individual genetic determinants of SSc susceptibility, it is necessary to increase the understanding of how these genetic polymorphisms relate to the development of SSc. Biological confirmation of these genetic alterations using functional studies is essential to determine whether these associations are, in fact, causal. Furthermore, several polymorphisms in a given individual may contribute to the individual risk of developing the disease.

In conclusion, our data, combined with other reports, points to a significant association of the IL-10 gene with SSc, but no association of NFKB1 gene with the disease. To our knowledge, this is the first study that examined the association of the NFKB1 gene with SSc. Further studies are necessary to further explore the subject and to delineate the genetic susceptibility pathways operating in distinct populations.

## REFERENCES

1. Mayes MD, Trojanowska M. Genetic factors in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther* 2007, 9 (Suppl 2):S5.
2. Oliveira CC, Teodoro WR, Velosa APP, et al. Autoimmunity and collagen V. *Rev Bras Reumatol* 2006, 46 (3):194-198
3. Ghosh AK. Factors involved in the regulation of type 1 collagen gene expression: implication in fibrosis. *Exp Biol Med* 2002, 227:301–314.
4. Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, et al. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. *J Immunol* 1992, 148: 3618–3623.
5. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997, 24: 1–8.
6. Timmann C, Fuchs S, Thoma C, et al. Promoter haplotypes of the interleukin-10 gene influence proliferation of peripheral blood cells in response to helminth antigen. *Genes Immun.* 2004, 5:256-260.
7. Ates O, Müsellim B, Ongen G, et AL. Association between 'interleukin' 10 gene (IL10) polymorphisms and systemic sclerosis with interstitial lung involvement. *Rheumatol Int* 2008, 28 (11):1123-1126.
8. Crilly A, Hamilton J, Clark CJ, et al. Analysis of the 5' flanking region of the interleukin 10 gene in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology* 2003, 42 (11):1295-1298.
9. Beretta L, Cappiello F, Barili M, et al. Proximal interleukin-10 gene polymorphisms in Italian patients with systemic sclerosis. *Tissue Antigens* 2007, 69 (4):305-312.
10. Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 2004, 6: 203-208.

11. Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CI, et al. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 2004, 13:35-45.
12. Le Beau MM, Ito C, Cogswell P, et al. Chromosomal localization of the genes encoding the p50/p105 subunits of NF-kappa B (NFKB2) and the I kappa B/MAD-3 (NFKBI) inhibitor of NF-kappa B to 4q24 and 14q13, respectively. *Genomics* 1992, 14: 529-531.
13. Handel ML, McMorrow LB, Gravallesse EM. Nuclear factor-kappa B in rheumatoid synovium. Localization of p50 and p65. *Arthritis Rheum* 1995, 38 (12):1762-1770.
14. Orozco G, Sanchez E, Collado MD, et al. Analysis of the functional NFKB1 promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2005, 65: 183-186.
15. Kim TH, Stone MA, Rahman P, et al. Interleukin 1 and nuclear factor-kappaB polymorphisms in ankylosing spondylitis in Canada and Korea. *J Rheumatol* 2005, 32(10):1907-1910.
16. Subcommittee for scleroderma criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutic Criteria. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Committee. *Arthritis Rheum* 1980, 23:581-590.
17. LeRoy EC, Medsger TA Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2001, 28:1573-1576.
18. Bredemeier M, Xavier RM, Capobianco KG, et al. Nailfold capillary microscopy can suggest pulmonary disease activity in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 2004, 31:286-294
19. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988, 15:202-205.
20. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988, 16:1215.
21. Atan J, Turner J, Kilmartin V, et al. Cytokine Gene Polymorphism in Sympathetic Ophthalmia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005, 46:4245– 4250.
22. Lewander A, Butchi AK, Gao J, et al. Polymorphism in the promoter region of the NFKB1 gene increases the risk of sporadic colorectal cancer in Swedish but not in Chinese populations. *Scand J Gastroenterol* 2007, 42: 1332-1338.
23. Perrey C, Pravica V, Sinnott PJ, et al. Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10 transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. *Transpl Immunol* 1998, 6: 193–197.

24. Yilmaz V, Yentur SP, Saruhan-Direskeneli G. IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. *Cytokine* 2005, 30: 188–194.
25. Peng WJ, Wang BX, Pan HF et al. Association of the interleukin-10 1082G/A, 819C/T and 3575T/A gene polymorphisms with systemic sclerosis: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2012 Jun;39(6):6851-5.
26. Eskdale J, Wordsworth P, Bowman S, et al. Association between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens.* 1997 Jun;49(6):635-9.
27. Gao M, Wang CH, Sima X, et al. NFKB1 -94 Insertion/Deletion ATTG Polymorphism Contributes to Risk of Systemic Lupus Erythematosus. *DNA Cell Biol* 2012, 31(4):611-615.
28. Kessel A, Rosner I, Rozenbaum M, et al. Increased CD8C T Cell Apoptosis in Scleroderma Is Associated With Low Levels of NF-kB. *J Clin Immunol* 2004, 24 (1): 30-36.
29. Chen F, Castranova V, Shi X, et al. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 1999, 45: 7–17.
30. Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, et al. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kB leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 1995, 80: 321–330.
31. Sun XF, Zhang H. NFKB and NFKBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. *Histol Histopathol* 2007, 22: 1387-1398.
32. Martinez A, Sanchez E, Valdivia A, et al. Epistatic interaction between FCRL3 and NFkappaB1 genes in Spanish patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006, 65: 1188–1191.
33. Zou YF, Wang F, Feng XL, et al. Association of NFKB1 -94ins/delATTG promoter polymorphism with susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases: a meta-analysis. *Tissue Antigens* 2011, 77: 9–17.
34. Wang P, Wu P, Siegel MI, et al. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 1995, 270 (16):9558-9563.
35. Yamamoto T, Eckers B, Kreig T. Effect of interleukin 10 on the gene expression of type 1 collagen, fibronectin and decorin in human skin fibroblasts: Differential regulation by transforming growth factor and monocyte chemoattractant protein-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 281:200–5.
36. Ten RM, Paya CV, Israel N, et al. The characterization of the promoter of the gene encoding the p50 subunit of NF-kB indicates that it participates in its own regulation. *EMBO J* 1992, 11: 195–203.

37. Zhang G, Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF- $\kappa$ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 2001, 107: 13–19.
38. Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ. Lessons from Nod2 studies: towards a link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends Immunol* 2003, 24: 652–658.
39. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF $\alpha$  therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol* 2001, 19: 163–196.

## TABLES

**Table 1.** Genotype distribution and allele frequencies of the IL-10 gene promoter (-1082, -819 and -592) and NFKB1 -94ins/delATTG Promoter Polymorphism in healthy control (n=147) and systemic sclerosis (151).

	Healthy Control n %	Systemic Sclerosis n %	P-Value*
<b>IL10 (-1082)</b>			
G	148 50.3	168 55.6	NS
A	146 49.7	134 44.4	
GG <sup>1</sup>	33 22.4	55 36.4	0.006
GA <sup>2</sup>	82 55.8	58 38.4	
AA	32 21.8	38 25.2	
<b>IL10 (-819)</b>			
C	162 55.1	139 46.0	NS
T	132 44.9	163 54.0	
CC <sup>3</sup>	43 29.3	21 13.9	0.005
CT <sup>4</sup>	76 51.7	97 64.2	
TT	28 19.0	33 21.9	
<b>IL10 (-592)</b>			
C	129 43.9	170 56.3	NS
A	165 56.1	132 43.7	
CC <sup>5</sup>	40 27.2	64 42.4	0.022
CA	49 33.3	42 27.8	
AA	58 39.5	45 29.8	
<b>NFKB1</b>			
W	128 43.5	135 44.7	NS
D	166 56.5	167 55.3	
WW	38 25.9	38 25.2	NS
WD	52 35.4	59 39.1	
DD	57 38.8	54 35.8	

\*Yates's corrected chi-square or Fisher's exact test

W = -94insATTG allele; D = -94delATTG allele. WW: homozygote wild-type; WD: heterozygote deletion; DD: homozygote deletion. NS: distributions were not significantly between patients and controls.

<sup>1</sup>P=0.012, OR=1.86, CI 95%: 1.12-3.11; <sup>2</sup>P=0.004, OR=0.49, CI 95%: 0.31-0.78; <sup>3</sup>P=0.002, OR=0.39, CI 95%: 0.21-0.69, <sup>4</sup>P=0.038, OR=1.67, CI 95%: 1.05-2.66; <sup>5</sup>P=0.009, OR=1.96, CI 95%: 1.21-3.19;

**Table 2.** Interleukin-10 haplotypes and phenotype distribution among healthy controls (n=147) and systemic sclerosis patients (n=151).

	Healthy Control n %	Systemic Sclerosis n %
<b>Haplotypes</b>		
<i>-1082/-819/-592</i>		
GCC	128 43,54	168 55,63
ACC	89 30,27	78 25,83
ATA	71 24,15	56 18,54
<b>Phenotypes<sup>a</sup></b>		
<i>High producers*</i>		
GCC <sup>+</sup> /GCC <sup>+</sup>	33 22,45	55 36,42
<i>Medium producers</i>		
GCC <sup>+</sup> /GCC <sup>-</sup>	62 42,18	58 38,41
<i>Low producers</i>		
GCC <sup>-</sup> /GCC <sup>-</sup>	32 21,77	38 25,17

<sup>a</sup>Classification of phenotypes based on previously published data (19, 20)

\*P=0.019, OR: 1.87, 95%IC: 1.10-3.19

**Table 3.** Interaction of NFKB1 (-94ins/delATTG) Promoter Polymorphism with Interleukin-10 Genotypes in healthy controls (n=147) and systemic sclerosis (n=151).

	Healthy Control n %	Systemic Sclerosis n %	P-Value*
<b>NFKB1 WW</b>			
IL10 (-1082) GA	24 63.2	19 50.0	NS
IL10 (-819) CC	17 44.7	5 13.2	0.005
IL10 (-592) CC	13 34.2	18 47.4	NS
<b>NFKB1 WD</b>			
IL10 (-1082) GA	25 48.8	17 28.8	NS
IL10 (-819) CC	13 25.0	8 13.6	NS
IL10 (-592) CC	10 19.2	26 44.1	0.01
<b>NFKB1 DD</b>			
IL10 (-1082) GA	33 57.9	22 40.7	NS
IL10 (-819) CC	13 22.8	8 14.8	NS
IL10 (-592) CC	17 29.8	20 37.0	NS

\*Yates's corrected chi-square or Fisher's exact test; NS: No significance

NFKB1 WW: homozygote wild-type; NFKB1 WD: heterozygote deletion; NFKB1 DD: homozygote deletion.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O papel dos genes da IL-10 em respostas autoimunes tem sido examinado em muitos modelos animais de doenças autoimunes, assim como os genes CXCR2, CXCL8 e NFKB1. As evidências destes estudos sugerem que estes genes podem afetar o desenvolvimento da autoimunidade através de muitos mecanismos.

A complexa fisiopatologia da esclerose sistêmica implica o envolvimento de genes que afetam, individualmente ou, mais provavelmente, em conjunto, a condução do processo da doença. Muitos destes genes foram associados com outras doenças autoimunes, tais como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide, o que sugere uma via comum genética para autoimunidade.

Os fatores genéticos podem contribuir para o desenvolvimento de respostas autoimunes. Aqui se apresentou quão os genes NFKB1, IL-10, CXCL8 e CXCR2 poderiam estar aludidos na iniciação e progressão da esclerose sistêmica. Existem ainda muitas divergências entre os estudos, mas isso se deve ao fato das populações serem geneticamente diferentes.

Portanto, a identificação de novas tecnologias de rastreamento de todo o genoma para avaliar o papel relativo desses genes em associação com outros genes na ES e estudos funcionais para tentar entender melhor esses genes na regulação da resposta imune inata e adaptativa e autotolerância será uma tarefa promissora e desafiadora para o futuro.

## APÊNDICE

### ***A – Protocolo de Pesquisa de Dados Clínicos***

#### *Serviço de Reumatologia - HCPA*

CASO: \_\_\_\_

DATA DA ENTREVISTA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

NOME: \_\_\_\_\_ REGISTRO: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_

IDADE: \_\_\_\_ anos

SEXO \_\_\_\_ (1-masc 2-fem) COR: \_\_\_\_ ( 1-branco 2-preto 3-misto)

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

NOME E ENDEREÇO DE PARENTE: \_\_\_\_\_

TELEFONE : casa: \_\_\_\_\_ celular: \_\_\_\_\_ TELEFONE DE PARENTE: \_\_\_\_\_

Falta de ar (MRC mod): \_\_\_\_

1. não tem falta de ar, exceto com atividade extrema;
2. incomodado pela falta de ar quando caminha rapidamente no plano ou sobe lomba leve;
3. anda mais devagar no plano que pessoas da mesma idade devido à falta de ar ou tem que parar

quando caminha no seu ritmo no plano;

3. pára para respirar após caminhar mais ou menos 100 metros ou após poucos minutos no plano;
4. muita falta de ar para sair de casa ou falta de ar ao vestir ou trocar de roupa.

NYHA: \_\_\_\_ (classe)

1. sem limitação; atividade rotineira sem fadiga exagerada ou dispnéia ou palpitação;
2. com pequena limitação de atividade física; bem em repouso; atividade rotineira causa fadiga, dispnéia ou palpitação;
3. limitação importante; dispnéia aos mínimos esforços; bem em repouso;
4. dispnéia em repouso; qualquer atividade com muito desconforto;

Fumo: \_\_\_\_ (1-sim 2-não 3- no passado) dos \_\_\_\_ aos \_\_\_\_ anos \_\_\_\_ cigs/dia.

O Sr.(a) tem pressão alta? \_\_\_\_ (1-sim 2-não) PA1: \_\_\_\_/\_\_\_\_ PA2: \_\_\_\_/\_\_\_\_ BRAÇO: \_\_\_\_ cm D E

Sr. (a) tem algum problema cardíaco) \_\_\_\_ Qual? \_\_\_\_\_

O Sr(a) tem diabetes? \_\_\_\_

Usa inibidor da ECA: \_\_\_\_ Verapa: \_\_\_\_ Nifedi: \_\_\_\_ Amlo: \_\_\_\_ Diltia \_\_\_\_

betabloqueador \_\_\_\_ diurético \_\_\_\_ AINE : \_\_\_\_ Qual? \_\_\_\_\_ outros (anotar): \_\_\_\_\_,

A medicação vasoativa será suspensa: \_\_\_\_ (1-sim 2-não)

Quantos dias antes ? \_\_\_\_ Por quê? \_\_\_\_\_

AINE será suspenso? \_\_\_\_ (1-sim 2-não)

Quantos dias antes? \_\_\_\_ Por quê? \_\_\_\_\_ CASO: \_\_\_\_

Dificuldade de deglutição: \_\_\_\_ (0-não; 1- sim, para pedaços de carne; 2- sim, para comer arroz e feijão; 3- sim, para líquidos) ou \_\_\_\_\_

Vezes: \_\_\_\_ por mês ou \_\_\_\_ por semana ou \_\_\_\_ dia ou sempre

Classifique a severidade do sintoma: \_\_\_\_ (0-não tem 1- leve 2-moderado 3- severo)

Tem azia ou pirose (queimação na boca do estômago ou atrás do peito)? \_\_\_\_ (1-sim 2-não)

Vezes: \_\_\_\_ por mês ou \_\_\_\_ por semana ou \_\_\_\_ dia ou sempre

Classifique a severidade do sintoma: \_\_\_\_ (0-não tem 1- leve 2- moderado 3- severo)

Tem dor ao engolir? \_\_\_\_ (1-sim 2-não)

Vezes: \_\_\_\_ por mês ou \_\_\_\_ por semana ou \_\_\_\_ dia ou sempre

Classifique a severidade do sintoma: \_\_\_\_ (0-não tem 1- leve 2- moderado 3- severo)

Vomita ou sente o conteúdo do estômago voltar até a garganta após as refeições ou longe delas? \_\_\_\_

Vezes: \_\_\_\_ por mês ou \_\_\_\_ por semana ou \_\_\_\_ dia ou sempre

Classifique a severidade do sintoma: \_\_\_\_ (0-não tem 1- leve 2- moderado 3- severo)

Costuma ter dor no peito ou atrás do peito ? \_\_\_\_

Vezes: \_\_\_\_ por mês ou \_\_\_\_ por semana ou \_\_\_\_ dia ou sempre

Classifique a severidade do sintoma: \_\_\_ (0-não tem 1- leve 2- moderado 3- severo)

Usa omeprazol ? \_\_\_ (1-sim 2-não)

Vezes: \_\_\_ por mês ou \_\_\_ por semana ou sempre

Usa rantidina, cimetidina, famotidina? \_\_\_ (1-sim 2-não)

Vezes: \_\_\_ por mês ou \_\_\_ por semana ou sempre

Usa cisaprida (prepulsid) ou metoclopramida (plasil )? \_\_\_ (1-sim 2-não)

Vezes: \_\_\_ por mês ou \_\_\_ por semana ou sempre

Desde quando começou a ter Raynaud? Há \_\_\_\_\_ anos.

Desde quando notou que a pele começou a ficar endurecida e lisa? Há \_\_\_\_\_ anos.

Quando foi diagnosticada a ES? Há \_\_\_\_\_ anos.

Responder a essas perguntas no dia da capilaroscopia (data \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_): CASO: \_\_\_\_\_

Temperatura na Zona 16: \_\_\_\_\_ °C

Temperatura do dia pela manhã: \_\_\_\_\_ °C

Horário em que entrou na Z16: \_\_\_\_\_

Horário da capilaroscopia: \_\_\_\_\_ (deve ser pelo menos 20 min após entrada na Z16)

Horário da coleta: \_\_\_\_\_ (logo após a capilo e em repouso). Raynaud durante a coleta? \_\_\_\_\_

PA1: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ FC1: \_\_\_\_\_ PA2: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ FC2: \_\_\_\_\_ (após as coletas)

Quantas vezes teve episódios de Raynaud (crises em que as mãos ficam pálidas -seguido ou não por cianose e/ou eritema- ou cianóticas) nos últimos 2 dias?

Anteontem: \_\_\_\_\_ minutos: \_\_\_\_\_ RCS: \_\_\_\_\_

Ontem: \_\_\_\_\_ minutos: \_\_\_\_\_ RCS: \_\_\_\_\_

Hoje: \_\_\_\_\_ minutos: \_\_\_\_\_ RCS: \_\_\_\_\_

Raynaud durante a capilo: \_\_\_\_\_

ESCALA : (nenhum Raynaud) **0—1—2—3—4—5—6—7—8—9—10** (o pior Raynaud que teve)

Fumou ontem? \_\_\_ (1-sim 2-não) Quantos cigarros? \_\_\_\_\_

Usou medicação vasoativa nos últimos 7 dias: \_\_\_\_ (1-sim 2-não)

Quais? \_\_\_\_\_

Usou medicação vasoativa nas últimas 24 horas: \_\_\_\_ Quais? \_\_\_\_\_

Usou AINE nos últimos 7 dias: \_\_\_\_ Qual? \_\_\_\_\_

Usou AINE nas últimas 24 horas: \_\_\_\_ Qual? \_\_\_\_\_

### **EXAME FÍSICO:**

#### **Critérios:**

Maior (esclerodermia simétrica proximal às MCFs ou MTFs): \_\_\_\_ (1-sim 2-não)

Menores:

esclerodactilia: \_\_\_\_ (1-sim 2-não)

pitting scars: \_\_\_\_

perda de substância distal: \_\_\_\_

fibrose em bases pulmonares ao Rx: \_\_\_\_

espessamento da pele proximal aos joelhos e cotovelos: \_\_\_\_ (1-sim 2-não)

calcinoses: \_\_\_\_ (1- sim 2- não)

teleangiectasias: \_\_\_\_ (1-sim 2-não)

Apresenta amputação de extremidades MsSs: \_\_\_\_ Quantos dedos: \_\_\_\_

Apresenta amputação de extremidades MsIs: \_\_\_\_ Quantos dedos: \_\_\_\_ CASO: \_\_\_\_

Apresenta úlceras ativas em MsSs: \_\_\_\_ Quantas: \_\_\_\_

Maior diâmetro das úlceras em MsSs em mm: \_\_\_\_\_

Apresenta úlceras ativas em MsIs: \_\_\_\_ Quantas: \_\_\_\_

Maior diâmetro das úlceras em MsIs em mm: \_\_\_\_\_

Crepitantes pulmonares: \_\_\_\_ (1-sim 2-não) escala (0- não 1- discreto 2- moderado 3- severo)

Área de crepitantes: (marcas: 5 cm abaixo das bordas inf. escapulares, metade das escápulas)

direita: 1/3inf \_\_\_\_ 1/3 médio \_\_\_\_ 1/3 sup \_\_\_\_

esquada: : 1/3inf \_\_\_\_ 1/3 médio \_\_\_\_ 1/3 sup \_\_\_\_

pulso radial D: \_\_\_\_ (número de cruces em 4) pulso radial esquerdo: \_\_\_\_

pulso femoral D: \_\_\_\_ femoral E: \_\_\_\_ pedioso D: \_\_\_\_ pedioso E: \_\_\_\_

### **SCORE CUTÂNEO**

Rodnan modificado por Clements: 0= normal 1- espessamento leve 2- moderado 3-severo

	DIREITA	ESQUERDA
Quirodáctilos	0 1 2 3	0 1 2 3
Mãos	0 1 2 3	0 1 2 3
antebraços	0 1 2 3	0 1 2 3
braços	0 1 2 3	0 1 2 3
face		0 1 2 3
tórax anterior		0 1 2 3
ABD		0 1 2 3
Coxas	0 1 2 3	0 1 2 3
pernas	0 1 2 3	0 1 2 3
dorso dos pés	0 1 2 3	0 1 2 3

abertura oral máxima: \_\_\_\_\_ mm (maior de 3 tentativas)

extensão ativa mão direita: \_\_\_\_\_ mm extensão ativa mão esquerda: \_\_\_\_\_ mm (maior de 3 tentativas)

fechamento ativo da mão (**menor de 3 tentativas**) direita: \_\_\_\_\_ mm esquerda: \_\_\_\_\_ mm

PESO: \_\_\_\_\_ Kg ALTURA: \_\_\_\_\_ cm.

CASO: \_\_\_\_\_

### **PROVAS DE FUNÇÃO PULMONAR** (data \_\_/\_\_/\_\_)

EXAMINADOR: \_\_\_\_\_

Capacidade pulmonar total: \_\_\_\_\_ ml (\_\_\_\_\_% do previsto)

Volume residual: \_\_\_\_\_ ml (\_\_\_\_\_% do previsto)

capacidade vital: : \_\_\_\_\_ ml (\_\_\_\_\_% do previsto)

capacidade vital forçada: : \_\_\_\_\_ ml (\_\_\_\_\_% do previsto)

VEF1: : \_\_\_\_\_ ml (\_\_\_\_\_% do previsto)

difusão de CO: \_\_\_\_\_% do previsto

coeficiente de transferência: \_\_\_\_\_% do previsto

**CINTILOGRAFIA DE TRÂNSITO ESOFÁGICO** (data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

EXAMINADOR: \_\_\_\_\_

líquido em pé: \_\_\_\_\_ % de estase em 60 seg, trânsito (80%) \_\_\_\_\_ seg; trânsito (90%) \_\_\_\_\_ ; área : \_\_\_\_\_

semi-sólido em pé: \_\_\_\_\_ % de estase em 60 seg; trânsito (80%) \_\_\_\_\_ seg; ; trânsito (90%) \_\_\_\_\_ ; área: \_\_\_\_\_

líquido deitado: \_\_\_\_\_ % de estase em 60 seg; trânsito (80%) \_\_\_\_\_ seg; ; trânsito (90%) \_\_\_\_\_ ; área: \_\_\_\_\_

semi-sólido deitado: \_\_\_\_\_ % de estase em 60 seg; trânsito (80%) \_\_\_\_\_ seg, ; trânsito (90%) \_\_\_\_\_ ; área: \_\_\_\_\_

OBS: área corresponde à area em que houve retenção.

**EXAMES DE LABORATÓRIO:**

Última creatinina sérica \_\_\_\_\_ mg/dl (data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

Última glicemia de jejum \_\_\_\_\_ mg/dl (data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

Última TGO \_\_\_\_\_ U/ml (data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

Última TGP \_\_\_\_\_ U/ml (data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

Última hemoglobina sérica \_\_\_\_\_ g/dl (data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

QUE (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) : \_\_\_\_\_

Último FAN em fígado de rato: 1/\_\_\_\_\_ data (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) padrão: \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_

Último FAN positivo em fígado de rato: 1/\_\_\_\_\_ data (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) padrão: \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_

Anti-DNA positivo : \_\_\_ (1-sim 2-não) ; título: 1/\_\_\_\_\_ ; data (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

U1-RNP: \_\_\_\_\_ Anti-SM: \_\_\_\_\_ Anti SS-A: \_\_\_\_\_ Anti SS-B: \_\_\_\_\_ Scl70: \_\_\_\_\_ (data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

FAN em HEP-2 (título): 1/\_\_\_\_\_ padrão \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_

Centrômero: \_\_\_ (1-sim 2-não) U1RNP: \_\_\_\_\_ Scl70: \_\_\_\_\_ DOSAGEM DE ET-1: \_\_\_\_\_

**B – Protocolo de Pesquisa de coleta de dados**

( ) Esclerose Sistêmica      *ou*      ( ) Grupo Controle

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Número do paciente: \_\_\_\_\_

Número do prontuário: \_\_\_\_\_

Raça: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Tipagem CXCL8:              alelo T ( )              alelo A ( )

Tipagem CXCR2:              alelo T ( )              alelo C ( )

Tipagem IL10 (-1082):      alelo G ( )              alelo A ( )

Tipagem IL10 (-819):      alelo C ( )              alelo T ( )

Tipagem IL10 (-592):      alelo C ( )              alelo A ( )

Tipagem NFKB1:              WW ( )              DD ( )              WD ( )

## ANEXOS

### ***Anexo I – Critérios estabelecidos pelo ACR para Esclerose Sistêmica***

#### 1980 CRITERIA FOR THE CLASSIFICATION OF SYSTEMIC SCLEROSIS

1. Typical sclerodermatous skin changes: tightness, thickening, and non-pitting induration, excluding the localized forms of scleroderma (morphea or linear scleroderma)
  - a. Sclerodactyly: above-indicated changes limited to (fingers and toes)
  - b. Proximal scleroderma: above-indicated changes proximal to the metacarpophalangeal or metatarsophalangeal joints, affecting other parts of the extremities, face, neck, or trunk (thorax or abdomen); usually bilateral, symmetrical and almost always including sclerodactyly
2. Other skin manifestations attributable to systemic sclerosis or comparison disorders
  - a. Digital pitting scars or loss of substance from the finger pad: depressed areas at tips of digits or loss of digital pad tissue as a result of digital ischemia rather than trauma or exogenous causes
  - b. Bilateral finger or hand edema: firm but pitting edema, especially involving fingers (includes puffy sausage-like swelling of fingers) or the dorsal aspect of the hands
  - c. Abnormal skin pigmentation: hyperpigmentation often containing areas of punctate or patchy hypopigmentation or depigmentation ("pepper and salt")
  - d. Raynaud's phenomenon: at least two-phase color change in fingers and often toes consisting of pallor, cyanosis, and/or reactive hyperemia in response to cold exposure or emotion, as determined by patient's history or physician's observation
3. Visceral manifestations
  - a. Bibasilar pulmonary fibrosis: bilateral reticular pattern of linear or lineonodular densities which are most pronounced in basilar portions of the lungs on standard chest roentgenogram; may assume appearance of diffuse mottling or "honeycomb lung," and should not be attributable to primary lung disease
  - b. Lower (distal) esophageal dysphagia: substernal discomfort on swallowing or sensation of food holdup in the retrosternal location
  - c. Lower (distal) esophageal dysmotility: hypoperistalsis or aperistalsis, as demonstrated by either cine esophagram or fluoroscopy or by manometric study, often accompanied by evidence of decrease in lower esophageal sphincter tone with reflux of gastric contents into the esophagus

Colonic sacculations: wide-mouthed diverticula of colon located along the antimesenteric border; found on barium enema examination; these sacculations may also occur in ileum and jejunum