

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGICA CELULAR,  
EMBRIOLOGIA E GENÉTICA  
LABORATÓRIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO C1858T DO GENE  
*PTPN22* COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO  
EM SANTA CATARINA, BRASIL**

**LARISSA DA SILVA LUZIETTI**

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Ilfada Rainha de Souza  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Yara Costa Netto Muniz

Florianópolis  
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR,  
EMBRIOLOGIA E GENÉTICA  
LABORATÓRIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO C1858T DO GENE  
*PTPN22* COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO  
EM SANTA CATARINA, BRASIL**

**LARISSA DA SILVA LUZIETTI**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito para cumprimento da disciplina  
TCCII (BIO7016) do currículo do Curso de  
Graduação em Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Ilfada Rainha de Souza  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Yara Costa Netto Muniz

Florianópolis  
2014

Larissa da Silva Luzietti

**ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO C1858T DO GENE *PTPN22*  
COM LUPUS ERITOMATOSO SISTÊMICO EM SANTA  
CATARINA BRASIL**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final com nota de 10,0 pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 19 de Dezembro de 2014

Dr.<sup>a</sup> Maria Risoleta Freire Marques  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

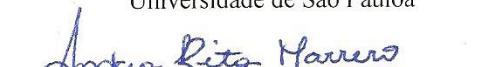
**Banca Examinadora:**

  
Dr.<sup>a</sup> Ilíada Rainha de Souza, Coorientadora,  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
Dr.<sup>a</sup> Yara Costa Netto Muniz, Orientadora,  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
Dr.<sup>a</sup> Sara Emelie Löfgren  
Universidade Federal de Santa Catarina

  
Bióloga Maria Luiza Guimarães de Oliveira,  
Universidade de São Paulo

  
Dr.<sup>a</sup> Andrea Rita Marrero,  
Universidade Federal de Santa Catarina

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COORDENADORIA DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BIO-5156 / ESTÁGIO II e BIO-7016

ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

1. ESTAGIÁRIO(A)

Nome: Larissa da Silva Luzietti

Número de Matrícula: 09228024

2. ESTÁGIO

Título do Trabalho: ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO C/858T DO GENE PTPN22 COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM SANTA CATARINA, BRASIL

Orientador(a): Dr.<sup>a</sup> Iliáda Rainha de Souza

Co-Orientador(a): Dr.<sup>a</sup> Yara Costa Netto Muniz

Período do Estágio: Agosto de 2014 a dezembro de 2014

Local da apresentação do Trabalho: Auditório BEG

3. AVALIAÇÃO

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: Professora Doutora Iliáda Rainha de Souza Nota: 10,0

Membro Titular: Doutora Sara Löfgren Nota: 10,0

Membro Titular Bióloga Maria Luiza Guimarães Nota: 10,0

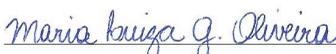
Membro Suplente: Professora Doutora Andrea Rita Marrero Nota: 10,0

MÉDIA FINAL: 10,0 ( dez )

Florianópolis, 19 de dezembro de 2014.

  
PRESIDENTE DA BANCA

  
MEMBRO TITULAR

  
MEMBRO TITULAR

  
MEMBRO SUPLENTE

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, onde estudei 5 anos na minha graduação em Ciências Biológicas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), órgãos financiadores dos projetos realizados no laboratório.

Aos voluntários, pacientes e controles, que disponibilizaram tempo e informação, o que tornou nossa pesquisa possível.

Aos funcionários e instituições que abriram portas e foram muito prestativos, permitindo que a pesquisa e a aplicação de conhecimentos andem juntas.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Iliada Rainha de Souza, que me encaminhou neste trabalho, sempre me ajudando e aconselhando não apenas em assuntos acadêmicos, sendo como uma mãe dentro da universidade.

À minha coorientadora, Dr<sup>a</sup> Yara Costa Neto Muniz, que com muita paciência sempre esclareceu minhas dúvidas e me ajudou neste processo, me ensinando como fazer pesquisa.

A todos integrantes e ex-integrantes do LAPOGE que me ajudaram nesses anos e me ensinaram a trabalhar em grupo.

À minha mãe e ao meu pai que sempre me apoiaram nas minhas decisões mesmo com medo e receio, e que me deram asas e raízes para que eu descobrisse mundos tendo um ponto de referência sólido.

À minha irmã e ao meu cunhado (irmão de coração) que com muito amor e carinho me fizeram crescer e ser uma pessoa mais feliz.

À Jéssica e Morgana que moraram comigo em Florianópolis e transformaram essa fase difícil em muitos momentos de alegrias. Também à Francine, que em um mês morando comigo ajudou no meu TCC como ninguém.

À Aline, Thaynara e Leandra que fizeram minha faculdade menos estressante e minhas angústias pessoais mais palpáveis. Especialmente à Leandra, que me entende mesmo quando minha mãe não consegue.

Ao meu namorado, Arturo, que tornou minha vida completa e permitiu que eu terminasse a faculdade com menos medo do futuro.

## RESUMO

LUZIETTI, L. S. Associação do polimorfismo C1858T do gene *PTPN22* com Lúpus Eritematoso Sistêmico em Santa Catarina, Brasil. Trabalho de Conclusão de Curso- Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2014.

Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica, caracterizada pela presença de autoanticorpos antinucleares que levam à inflamação tecidual em múltiplos órgãos. Fatores genéticos, ambientais e fisiológicos interagem para o seu desenvolvimento. Um dos genes que pode estar envolvido no aparecimento de LES é o gene *PTPN22*, que codifica a proteína Lyp, relacionada à regulação do sistema imune. O SNP rs2476601 deste gene resulta na transição de citosina para timina na posição 1858 (C1858T), o que provoca substituição do aminoácido arginina para triptofano na posição 620 (R620W) da proteína Lyp. Essa substituição altera a função catalítica da proteína, o que pode afetar a resposta efetiva do sistema imunológico. Com base nessas informações, este estudo pretendeu determinar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo rs2476601 e analisar sua associação com a doença em indivíduos moradores do estado de Santa Catarina, Brasil. Para a realização do estudo, foram coletados sangue, do qual foi extraído DNA para posterior genotipagem por PCR-RFLP e dados epidemiológicos de 155 pacientes e 227 controles. As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas e as últimas foram testadas para o EHW. A análise estatística foi feita através do teste de *Odds Ratio* (OR), com intervalo de confiança (IC) de 95% e limite de significância em  $p \leq 0,05$ . No presente estudo, casos e controles estão em EHW ( $p_{\text{casos}}=0,379$ ;  $p_{\text{controles}}=0,445$ ) e a distribuição dos genótipos e alelos está diferenciada entre casos e controles ( $\chi^2=9,55905$ ;  $p=0,008$ /  $\chi^2=11,37976$ ;  $p=0,003$ ). Foi encontrada associação da presença do alelo T com LES (OR=2,236;  $p=0,011$ ; IC95%= 1,189-4,221), mas não com os dados clínicos estudados. O hábito tabagista (OR=2,217;  $p=0,007$ ; IC95%= 1,232-3,997), assim como o tabagismo em indivíduos que possuíam o alelo T (OR=11,019;  $p=0,019$ ; IC95%= 1,301-248,790) se mostraram associados com a doença. Desta forma, este trabalho conclui que o SNP rs2476601, assim como o hábito tabagista, separadamente ou agrupados, estão associados ao desenvolvimento do LES.

Palavras chave: LES, Lyp, SNP rs2476601.

## ABSTRACT

LUZIETTI, L S. Association of *PTPN22* gene polymorphism *C1858T* with systemic lupus erythematosus in Santa Catarina State, Brazil. Final Project - Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 2014.

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease, characterized by the existence of antinuclear autoantibodies, which trigger tissue inflammation in multiple organs. Genetic, environmental, and physiologic factors interact to develop the disease. One gene that can be evolved in the onset of the disease is *PTPN22* gene, which codifies Lyp protein, strongly linked in T cell activation. The SNP rs2476601 of this gene results in transition of cytosine for thymine in the position 1858 (C1858T), causing substitution of arginine by tryptophan aminoacid (R620W) in the Lyp protein. This substitution alters the catalytic function of the protein, which may affect the effective response of the immune system. Based on these knowledges, this study aimed to determinate the allele and genotype frequencies of rs2476601 polymorphism and analyze its association with disease in individuals living in the state of Santa Catarina, Brazil. To accomplish this study, blood and epidemiological data were collected from 155 patients and 227 controls. DNA was extracted from blood to gene genotyping by PCR-RFLP. Allelic and genotypic frequencies were obtained and the last one was tested for EHW. Statistical analyzes were done by *Odds Ratio* (*OR*) with confidence interval (*CI*) of 95% and threshold for significance of  $p \leq 0.05$ . In this study, cases and controls are in EHW ( $p_{\text{cases}} = 0.379$ ;  $p_{\text{controls}} = 0.445$ ) and the genotypic and allelic distribution is dispair in cases and controls ( $\chi^2 = 9.55905$ ;  $p = 0.008$  /  $\chi^2 = 11.37976$ ;  $p = 0.003$ ). It was found association between the T allele of C1858T polymorphism and SLE ( $OR = 2.236$ ;  $p = 0.011$ ;  $IC95\% = 1.189 - 4.221$ ), but not with clinical data. Smoking was associated with the disease ( $OR = 2.217$ ;  $p = 0.007$ ;  $IC95\% = 1.232 - 3.997$ ) as well as the presence of the T allele of the studied polymorphism and smoking together ( $OR = 11.019$ ;  $p = 0.019$ ;  $IC95\% = 1.301 - 248.790$ ). Therefore, this study concludes that the polymorphism rs2476601, likewise smoking, separated or combined, are associated with SLE development.

Keywords: SLE, Lyp, SNP rs2476601.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Critérios do <i>American College of Rheumatology</i> para o diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	19
<b>Tabela 2.</b> Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ) utilizados na PCR para o polimorfismo rs2476601 do gene <i>PTPN22</i> .....	34
<b>Tabela 3.</b> Mi <sup>x</sup> de reagentes para a PCR para o polimorfismo rs2476601 do gene <i>PTPN22</i> .....	34
<b>Tabela 4.</b> Programa de ciclagem da PCR para o polimorfismo rs2476601 do gene <i>PTPN22</i> .....	34
<b>Tabela 5.</b> Classificação das amostras de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (casos) e de indivíduos sem a doença (controles) quanto à distribuição de gênero e etnia, e à idade média dos indivíduos amostrados e os valores de <i>p</i> obtidos através de testes de homogeneidade entre as duas amostras para tais parâmetros.....	38
<b>Tabela 6.</b> Distribuição das frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo C1858T do gene <i>PTPN22</i> em pacientes e controles do estado de Santa Catarina.....	39
<b>Tabela 7.</b> Cálculos de associação (OR), valores de <i>p</i> e intervalo de confiança (IC, 95%) para casos e controles em relação à presença ou ausência do alelo T do polimorfismo C1858T do gene <i>PTPN22</i> .....	40
<b>Tabela 8.</b> Revisão de estudos de associação com polimorfismo do gene <i>PTPN22</i> com doenças autoimunes.....	43
<b>Tabela 9.</b> Cálculos de associação (OR), valores de <i>p</i> e intervalo de confiança (IC, 95%) para pacientes com ou sem diferentes manifestações clínicas em relação à presença ou ausência do alelo T do polimorfismo C1858T do gene <i>PTPN22</i> .....	44
<b>Tabela 10.</b> Cálculos de associação (OR), valores de <i>p</i> e intervalo de confiança (IC, 95%) para casos e controles em relação ao hábito tabagista.....	48
<b>Tabela 11.</b> Cálculos de associação (OR), valores de <i>p</i> e intervalo de confiança (IC, 95%) para casos e controles em relação ao hábito tabagista e à presença ou ausência do alelo T do polimorfismo C1858T do gene <i>PTPN22</i> .....	49

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fatores ambientais genéticos influenciam e encaminham a resposta immune.....	20
<b>Figura 2.</b> Hipótese para sequência de eventos no lúpus.....	21
<b>Figura 3.</b> Inativação de LcK (4) pela proteína Lyp (3).....	25
<b>Figura 4.</b> Variante C1858T do gene <i>PTPN22</i> .....	27
<b>Figura 5.</b> Ganho de função da proteína variante <i>PTPN22</i> (R620W).....	28
<b>Figura 6.</b> Genotipagem do polimorfismo rs2476601 do gene <i>PTPN22</i> .....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígenos, do inglês <i>Antigen-presenting Cell</i>
Csk	Proteína Regulatória Negativa, do inglês c-Src-cinase
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
HLA	Antígenos leucocitários humanos, do inglês <i>Human Leukocyte Antigens</i>
HU	Hospital Universitário
IC	Intervalo de Confiança
IFN	Interferon
ITAMs	Motivos de Ativação Baseados em Tirosina, do inglês <i>Immunotyrosine-based activatory motif</i>
LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
Lck	Do inglês <i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
Lyp	Do inglês <i>lymphoid tyrosine phosphatase</i>
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	Do inglês <i>Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PTP	Proteína Tirosina Fosfatase
SH3	Domínio de Homologia a Src 3
SNP	Polimorfismos de um Único Nucleotídeo, do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TCR	Receptor de Linfócito T, do inglês <i>T-Cell Receptor</i>
Th	<i>T-helper</i>
Treg	T regulatórios, do inglês <i>T Regulatory</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
1.1	SISTEMA IMUNE E TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA.....	13
1.2	AUTOIMUNIDADE .....	14
1.3	LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.....	15
1.4	PATOLOGIA DO LES.....	17
1.5	ETIOLOGIA DO LES .....	20
1.5.1	FATORES FISIOLÓGICOS, CELULARES E MOLECULARES .....	20
1.5.2	FATORES AMBIENTAIS .....	23
1.5.3	FATORES GENÉTICOS.....	23
1.6	GENE <i>PTPN22</i> .....	24
1.6.1	LYP E REGULAÇÃO IMUNE.....	24
1.6.2	SNP rs2476601 .....	26
2	JUSTIFICATIVA.....	30
3	OBJETIVOS .....	31
3.1	OBJETIVO GERAL .....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	32
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	32
4.2	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	32
4.3	COLETA DE DADOS E MATERIAL BIOLÓGICO.....	32
4.4	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE E EXTRAÇÃO DO DNA .....	33
4.5	GENOTIPAGEM <i>PTPN22</i> .....	33
4.5.1	AMPLIFICAÇÃO DO DNA .....	33
4.5.2	DIGESTÃO DAS AMOSTRAS E ELETROFORESE .....	35
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
4.6.1	ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO COM MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS 37	
4.6.2	ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E GENOTÍPICA 37	
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	38
5.2	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	38
5.2.1	EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG.....	39
5.2.2	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO COM LES.....	39

5.2.3	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ANÁLISES DE ASSOCIAÇÕES SINTOMÁTICAS.....	45
5.2.4	ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA .....	47
5.2.5	ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E GENOTÍPICA 48	
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
7	PERSPECTIVAS .....	51
8	REFERÊNCIAS:.....	52
	ANEXOS .....	52

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 SISTEMA IMUNE E TOLERÂNCIA IMUNOLÓGICA

O sistema imune contribui para manutenção da homeostase do organismo ao reconhecer antígenos e neutralizar patógenos e células anormais através de dois mecanismos: imunidade inata e adaptativa (LETTRE; RIOUX, 2008; MACREZ *et al.*, 2011). A primeira geralmente é relacionada com respostas imediatas e inespecíficas e a segunda, com defesa de longa duração (GREGERSEN; BEHRENS, 2006; MACREZ *et al.*, 2011). Enquanto que a imunidade tem como característica uma resposta inflamatória marcada pela liberação de quimiocinas e citocinas pro-inflamatórias (MACREZ *et al.*, 2011), a imunidade adaptativa depende do reconhecimento altamente específico do antígeno apresentado, através dos receptores dos linfócitos T (TCR) e B (DORIA *et al.*, 2012).

Os linfócitos possuem uma grande diversidade de receptores de antígenos que são gerados através de rearranjos genéticos (SAWANT; VIGNALI, 2014). Estima-se que um homem adulto possua no mínimo 100 milhões de sequências diferentes de TCRs beta em linfócitos imaturos (QI *et al.*, 2014). Isso garante que os linfócitos possuam um largo repertório contra antígenos variados (SAWANT; VIGNALI, 2014).

Em condições saudáveis, os linfócitos T e B são constantemente apresentados a antígenos do próprio organismo e a antígenos provenientes do meio externo, como da comida, das bactérias da flora intestinal e de constituintes do ar, contudo, não geram uma resposta imune a eles. Isto acontece porque o sistema imune adquire tolerância imunológica através da exposição prévia a estes antígenos (HADEIBA; BUTCHER, 2013; SAWANT; VIGNALI, 2014). Para manutenção da tolerância e estabelecimento da especificidade, os linfócitos T e B passam por um processo de maturação e seleção nos órgãos linfoides centrais, timo e medula óssea, respectivamente (GUPTA; LOUIS, 2013).

Durante a seleção dos linfócitos T os antígenos próprios são apresentados por moléculas de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) endógenas aos TCRs em desenvolvimento (BURN *et al.*, 2011; STRITESKY; JAMESON; HOGQUIST, 2012). Os linfócitos que apresentam reatividade excessiva, ou que não são capazes de reconhecer

o autoantígeno apresentado, sofrem apoptose pelo processo de seleção negativa. Enquanto os linfócitos T que reconhecem os autoantígenos com afinidade moderada são selecionados positivamente e migram para os órgãos linfoides periféricos, onde podem terminar a maturação celular e se diferenciar em linfócitos T CD4+ ou T CD8+, efetores ou de memória (GUPTA; LOUIS, 2013).

Os linfócitos T CD4+ *helper* (Th) naives, por sua vez, podem se diferenciar em outras células como nos linfócitos Th17 e nos linfócitos T regulatórios (Treg), dependendo da ativação que essas células recebem. Cada grupo de linfócitos expressa um perfil único que citocinas e possui funções próprias (RAPHAEL *et al.*, 2014).

Os linfócitos Treg possuem como função manter a autotolerância e suprimir respostas imunes. Na periferia dos órgãos linfoides, esses linfócitos são capazes de inibir a função das células apresentadoras de antígeno e bloquear a ativação e a atividade de outros linfócitos T, controlando células autorreativas que por ventura não tenham sofrido a seleção negativa necessária (SAWANT; VIGNALI, 2014; STRITESKY; JAMESON; HOGQUIST, 2012).

Os linfócitos Th-17 são células pró-inflamatórias produtoras de IL-17, que por sua vez estimulam a produção de citocinas, proliferação e recrutamento de neutrófilos, macrófagos e linfócitos (ONISHI; GAFFEN, 2010; TOWER *et al.*, 2013).

No processo de maturação e seleção, os linfócitos B também são expostos aos antígenos próprios. Aqueles que possuem afinidade exacerbada sofrem apoptose, porém nesse caso pode ocorrer rearranjo gênico das cadeias das imunoglobulinas (GUPTA; LOUIS, 2013). Na periferia, a tolerância dos linfócitos B é mediada por mecanismos como deleção clonal de linfócitos maduros com alta afinidade a autoantígenos e inibição pelos linfócitos Treg (PILLAI; MATTOO; CARIAPPA, 2011).

## 1.2 AUTOIMUNIDADE

Eventualmente o sistema imune pode perder a tolerância imunológica e respostas imunes não controladas são dirigidas a antígenos do próprio organismo, levando a autoimunidade (LETTRE; RIOUX, 2008; LU, 2013). A resposta autoimune pode ser estimulada por fatores exógenos, como infecções e endógenos, como a influência

do *background* genético, estresse psicológico e disfunções nos linfócitos, como alta reatividade (DORIA *et al.*, 2012).

Existem evidências da contribuição genética na autoimunidade. São elas: (I) associações de doenças autoimunes a polimorfismos de genes que codificam moléculas relacionadas ao sistema imunológico, como genes do complexo MHC; (II) observação de que a concordância de fenótipo é significativamente maior em gêmeos monozigóticos que em gêmeos dizigóticos (AMUR; PAREKH; MUMMANENI, 2012; LU, 2013).

A concordância incompleta em gêmeos monozigóticos, no entanto, é um dos indícios que fatores não genéticos estão envolvidos no desenvolvimento da autoimunidade. A variação observada na prevalência dessas doenças, conforme a área geográfica e a etnia estudada, corrobora a presença de contribuição de fatores ambientais na autoimunidade (AMUR; PAREKH; MUMMANENI, 2012; POLLARD, 2012).

As doenças autoimunes podem ser classificadas de acordo com as diferenças observadas no quadro clínico. Desta forma, são agrupadas em órgão-específicas, quando acometem um tecido ou órgão específico ou sistêmicas, quando a injúria tecidual afeta múltiplos órgãos e tecidos, como é o caso do Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (GREGERSEN; BEHRENS, 2006; SCHLEINITZ *et al.*, 2010).

### 1.3 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O LES é classificado como uma doença autoimune, caracterizada pela proliferação de autoanticorpos, sendo os mais comuns autoanticorpos antinucleares. A presença desses anticorpos e a reação imune presente no LES levam à inflamação e lesão tecidual em múltiplos órgãos (BALLESTAR; ESTELLER; RICHARDSON, 2006; REKVIG; VAN DER VLAG, 2014).

Estudos mostram que a incidência de LES na Europa é em torno de 4,8 novos casos por ano, para cada 100.000 habitantes, e nos EUA de 2,0-7,6 novos casos por ano (KUNZ, 2013). No Brasil, estima-se que existam 65.000 indivíduos com LES e no estado de Santa Catarina, somente entre a população feminina, existem aproximadamente 3.700 casos. Portanto, o LES é considerado pelos reumatologistas uma doença relativamente comum (SBR, 2014).

O LES pode acometer crianças (lúpus pediátrico) ou indivíduos com mais de 50 anos (lúpus tardio). A idade de manifestação da doença pode influenciar o curso e evolução da mesma. Pacientes diagnosticados com LES antes dos 16 anos (8 a 15% dos casos) geralmente apresentam pior prognóstico, com maior comprometimento sistêmico, relacionado principalmente ao envolvimento renal e neuropsiquiátrico. Os pacientes com lúpus tardio (18% dos casos) apresentam uma doença menos ativa e com menor envolvimento sistêmico (TSOKOS; GORDON; SMOLEN, 2007).

A doença possui uma grande variação entre gêneros, tanto na sua presença, como nos sintomas. Dentre os homens o tempo de diagnóstico é menor e as manifestações mais frequentes são problemas neurológicos, renais, anemia hemolítica e hipertensão arterial. Por outro lado, artrite e artalgia são mais observadas em mulheres (GARCIA *et al.*, 2005), grupo no qual a doença é mais frequente, acometendo nove mulheres para cada homem (AMUR; PAREKH; MUMMANENI, 2012).

A alta incidência de LES entre as mulheres ainda não é completamente compreendida, contudo microquimerismo celular (KREMER HOVINGA *et al.*, 2007), a dose dupla do cromossomo X e o envolvimento de hormônios sexuais estão sendo estudados (SCHWARTZMAN-MORRIS; PUTTERMAN, 2012). Níveis elevados dos hormônios estrógenos podem estar envolvidos no desenvolvimento de LES (LAHITA, 1999; KUNZ, 2013). Durante a idade reprodutiva e período gestacional (KUNZ, 2013), os riscos de desenvolver LES são maiores enquanto que na pré-puberdade e menopausa, quando os níveis hormonais estão mais baixos, as chances de desenvolver a doença são menores (DEVLIN; COSTENBADER, 2000; SCOFIELD *et al.*, 2010; ALONSO-PEREZ *et al.*, 2014).

Hormônios femininos podem contribuir na quebra da homeostase imunológica, uma vez que estrógenos mantêm a sobrevivência dos linfócitos B autorreativos e diminuem a regulação de linfócitos T em ratos. Entretanto, o envolvimento de hormônios em pacientes lúpicos não é totalmente claro, uma vez que pacientes nos primeiros meses pós-diagnóstico (segundo e terceiro trimestre) apresentam níveis de estradiol e progesterona mais baixos que o normal (KUNZ, 2013).

Em relação à base genética, é proposto que a dose dupla do cromossomo X, em mulheres, pode influenciar o desenvolvimento da doença (SMITH-BOUVIER *et al.*, 2008; MOULTON; TSOKOS, 2012). Ratos geneticamente modificados com maiores números de

cromossomos X apresentam maior severidade da doença (TSOKOS, 2011; KUNZ, 2013) e pacientes com síndrome de Klinefelter (47, XXY), que possuem fenótipo típico masculino, mas dois cromossomos X, possuem aproximadamente 14 vezes mais risco de desenvolver lúpus que homens com cariótipo normal (46, XY) (SCOFIELD *et al.*, 2010).

#### 1.4 PATOLOGIA DO LES

O lúpus apresenta fases remitentes e residentes e muitos órgãos e tecidos podem ser afetados. No princípio a doença costuma ser aguda, com inflamação e vasculite, mas com o tempo torna-se crônica e persistente (BORBA *et al.*, 2008; AMUR; PAREKH; MUMMANENI, 2012).

O LES pode afetar praticamente todas as partes do corpo, por isso é considerado sistêmico. É comum o envolvimento de pele e mucosas, fazendo com que o símbolo da doença seja a erupção facial em forma de borboleta (WALLING; SONTHEIMER, 2009), decorrente da alta fotossensibilidade dos pacientes à radiação UV (BORBA *et al.*, 2008). No curso da doença, os pacientes podem apresentar manifestações como comprometimento pulmonar, hepático e problemas renais, presentes em cerca de 50% dos indivíduos com a doença (BORBA *et al.*, 2008; SBR, 2009).

Mais da metade dos pacientes de LES desenvolve leucopenia, porém um pouco menos da metade, apresenta a mancha em forma de borboleta. Dentre os pacientes lúpicos, aproximadamente 45% possui elevado grau de autoanticorpo anti-dsDNA. Artrite possui alta frequência entre os pacientes, estando presente em 38,8% dos casos. Trombocitopenia é observada em torno de 22% dos pacientes, enquanto que a anemia hemolítica autoimune e distúrbio no sistema nervoso central são vistos em aproximadamente 10% dos afetados com LES. Problemas cardíacos afetam menos de 2%, contudo, ainda são considerados um agravante da doença (SAHEBARI *et al.*, 2014).

O diagnóstico do LES é baseado nos critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (do inglês, *American College of Rheumatology*) (TSOKOS, 2011), que determina que para estabelecer o diagnóstico é necessário observar a presença de pelo menos quatro dos onze critérios apresentados na tabela 1 (TAN *et al.*, 1982). Esses critérios incluem detecção de anticorpos antinucleares e anti-DNA, testes sorológicos e imunopatológicos (TAN *et al.*, 1982). Além desses,

testes histológicos e genéticos podem ser realizados para aumentar o poder de discriminação do LES de outras doenças (ZIEMER; MILKOVA; KUNZ, 2014).

**Tabela 1.** Critérios do *American College of Rheumatology* para o diagnóstico do Lúpus Eritematoso Sistêmico.

<b>Critério</b>	<b>Definição</b>
<b>Eritema (Rash) Malar</b>	Eritema nas bochechas e nariz, frequentemente na forma de asa de borboleta
<b>Eritema Discoide</b>	Erupção cutânea avermelhada, elevada e em forma de disco
<b>Fotossensibilidade</b>	Reação à luz solar que provoca o aparecimento de uma erupção ou a piora de uma existente
<b>Úlcera Oral</b>	Feridas na boca
<b>Artrite</b>	Dores nas articulações e inchaço de duas ou mais articulações (em simetria bilateral)
<b>Serosite</b>	Inflamação no tecido que envolve os pulmões (pleurite) ou inflamação das membranas que envolvem o coração (pericardite)
<b>Distúrbio Renal</b>	Presença de proteína ou matriz celular na urina
<b>Distúrbio Neurológico</b>	Convulsões ou psicoses
<b>Distúrbio Hematológico</b>	Anemia (baixa contagem de células vermelhas), leucopenia (baixa contagem de células brancas), linfopenia (baixo nível de determinados glóbulos brancos) ou trombocitopenia (baixa contagem de plaquetas)
<b>Distúrbio Imunológico</b>	Teste positivo para anti-DNA de dupla hélice, anti-Sm ou anticorpos antifosfolípides
<b>Anticorpos Antinucleares</b>	Teste positivo para anticorpo antinuclear

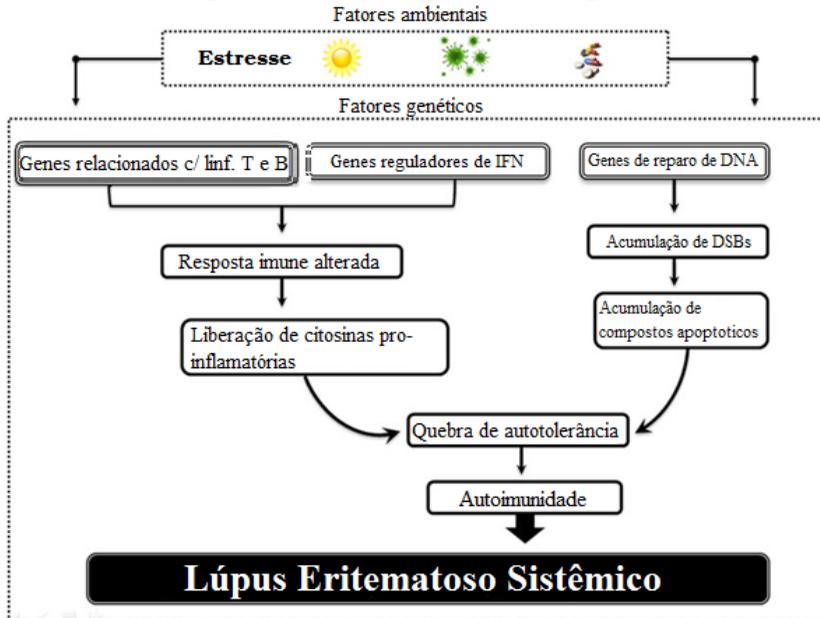
**Fonte:** Adaptado de TAN *et al.* (1982).

Ao longo do curso da doença, os indivíduos com LES apresentam diversas manifestações clínicas. Cada paciente possui características distintas, de modo que o tratamento deve ser realizado de forma individualizada e respeitando os períodos de atividade e remissão da doença, pois isso irá influenciar a conduta medicamentosa (SMITH; GORDON, 2010; ZIEMER; MILKOVA; KUNZ, 2014). O tratamento medicamentoso dos pacientes com LES é realizado principalmente através do uso de antimaláricos e glicocorticoides e de modo geral, em períodos de atividade sistêmica da doença, aconselha-se o repouso, alimentação saudável e uso de protetores solares (BORBA *et al.*, 2008).

A manipulação celular está sendo estudada como possível tratamento de LES. Terapias alternativas incluem indução de deleção de linfócitos B, assim como redução na proliferação, diferenciação e função dessas células (HARVEY; GORDON, 2013; SANZ, 2014).

## 1.5 ETIOLOGIA DO LES

Embora as causas do LES não sejam totalmente esclarecidas, sabe-se que esta é uma doença multifatorial que envolve simultaneamente fatores genéticos, ambientais e fisiológicos (ZIEMER; MILKOVA; KUNZ, 2014). Assim, fatores genéticos e ambientais se unem para gerar disfunções fisiológicas que acarretam na doença (Figura 1).



**Figura 1.** Fatores ambientais e genéticos encaminham a resposta imune.

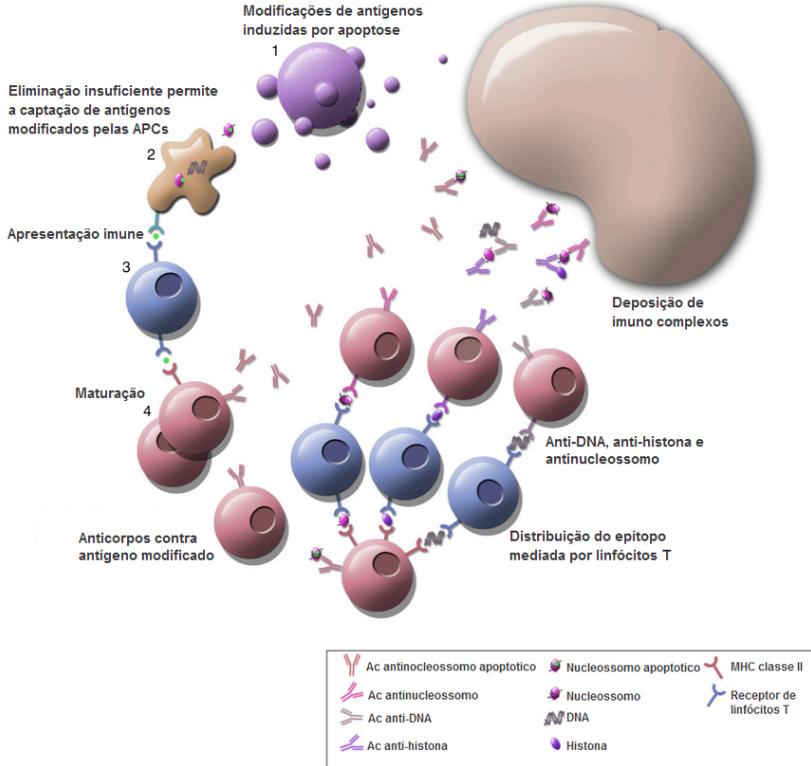
Fatores ambientais influenciam a atuação de genes que por sua vez levam a disfunções fisiológicas com quebra de autotolerância, autoimunidade e desenvolvimento de LES.

**Fonte:** Adaptado de SILVA *et al.* (2014).

### 1.5.1 FATORES FISIOLÓGICOS, CELULARES E MOLECULARES

Sob condições fisiológicas, a presença de células apoptóticas é interpretada como um sinal anti-inflamatório (CRISPIN, *et al.*, 2010). No LES, o aumento de apoptose celular está intimamente relacionado com o desenvolvimento da doença. A apoptose de linfócitos e monócitos permite que componentes intracelulares, incluindo compostos nucleares, sejam expostos. Desta forma células do sistema imune podem

reconhecê-los e digeri-los. Essa exposição prolongada, em pacientes que apresentam doença autoimune, leva ao aumento de produção de autoanticorpos e consequente inflamação (PARK *et al.*, 2014) (Figura 2).



**Figura 2.** Hipótese para sequência de eventos no lúpus. Células sofrem apoptose (1) e compostos intracelulares, como nucleossomos e DNA, são expostos. Em pacientes com lúpus esses compostos, com antígenos próprios, não são removidos corretamente e células apresentadoras de antígenos (2) podem recolhê-los e apresentá-los aos linfócitos T (3). Assim, os linfócitos T estimulam os linfócitos B a produzirem autoanticorpos (4). Esses processos causam inflamação, mostrado na figura, no rim.

**Fonte:** Adaptado de VAN BAVEL *et al.* (2010).

O alto grau de apoptose encontrado na medula óssea de pacientes com LES pode gerar grande produção de autoanticorpos antinucleares. A apoptose desregulada faz com que células plasmáticas da medula

óssea, juntamente com IL-6, produzam anticorpos anti-dsDNA, além de aumentar o número de células dendríticas plasmocitoides, que reconhecem ácidos nucleicos próprios e assim produzem interferon (IFN) tipo I, levando a desregulação imunológica presente no LES (PARK *et al.*, 2014). Um pequeno desvio do funcionamento esperado das células do sistema imune pode desencadear uma resposta desregulada do organismo, resultando nos sintomas de LES. A hiperatividade de linfócitos T e B e a desregulação no funcionamento dos linfócitos Treg e Th17 podem ainda contribuir com a doença (TOWER *et al.*, 2013).

Acredita-se que os linfócitos T direcionam o desenvolvimento da doença ao determinar a ação dos autoanticorpos, pois 25% da população saudável possui anticorpos antinucleares circulantes sem desenvolver o LES (WANDSTRAT *et al.*, 2006). Linfócitos T atacam os tecidos próprios, estimulam a inflamação através da secreção de citocinas, ativação de células dendríticas e linfócitos B (CRISPÍN *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2009). Em comparação com pessoas saudáveis, pacientes com LES apresentam maior produção de linfócitos T CD4 e CD68, mostrando que essas células podem fazer parte da imunopatogênese da doença (PARK *et al.*, 2014).

Além dos linfócitos T, os linfócitos B também contribuem para a imunopatogênese do LES, pois são produtores de anticorpos, inclusive de autoanticorpos que podem desencadear a autoimunidade, sendo essas células fonte para anticorpos presentes em pacientes com LES, como anti-dsDNA, anticromatina e nucleossomos e anti-Sm (CAPPIONE III *et al.*, 2005; SANZ, 2014).

Linfócitos B podem ainda cooperar com a doença ao apresentarem antígenos e autoantígenos aos linfócitos T e ao regular a resposta imune a partir de secreção de citosinas (ZHOU *et al.*, 2009; TSOKOS, 2011). Em pacientes com LES linfócitos B podem apresentar anormalidades que propiciam e aceleram a patogênese (SANZ, 2014).

A hiperatividade e desregulação de linfócitos T e B provavelmente são influenciados por anormalidades nos linfócitos Treg, os quais controlam essas células (HORWITZ, 2010). Desta forma os linfócitos Treg, assim como Th-17, têm uma grande importância na manutenção da tolerância imunológica e no possível desenvolvimento de lúpus.

Estudos indicam que pacientes com LES possuem redução no número de linfócitos Treg e aumento de linfócitos Th-17 (GERLI *et al.*, 2009; TOWER *et al.*, 2013). Outros estudos mostram aumento de

linfócitos Treg CD4+ e CD25- em pacientes lúpicos, porém esses linfócitos reguladores não conseguem inibir linfócitos T tão eficientemente como os de pessoas saudáveis. Isso ocorre porque as células apresentadoras de antígenos (APCs) desses pacientes não permitem que linfócitos Treg exerçam sua função apropriada e inibam a proliferação de células, por meio de alta produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, Fator de Necrose Tumoral (TNF) e IFN $\alpha$  (YAN *et al.*, 2008).

### 1.5.2 FATORES AMBIENTAIS

Os processos fisiológicos que acarretam o LES são fortemente influenciados pela ação de fatores externos, que tanto podem propiciar quanto proteger o indivíduo do aparecimento e desenvolvimento da doença. Sabe-se que o LES está intimamente relacionado com forte exposição à radiação ultravioleta, que gera fotossensibilidade nos pacientes (KUNZ, 2013). Além disso, o uso prolongado de alguns medicamentos, tabagismo e exposição a hormônios também são fatores de risco à doença (KARLSON *et al.*, 2007; MOULTON; TSOKOS, 2012; SBR, 2014).

Estudos sugerem que fatores étnicos e socioeconômicos influenciam na severidade e mortalidade da doença, devido às diferenças em tempo de diagnóstico, tratamento e suporte social (PONS-ESTEL *et al.*, 2010). Exposição a compostos e elementos químicos como sílica e mercúrio foram associados com LES (PARKS; COOPER, 2006), assim como pesticidas e solventes, contudo esses estudos não são totalmente conclusivos (PARKS; DE ROOS, 2014).

### 1.5.3 FATORES GENÉTICOS

A diferença observada na taxa de concordância da doença entre gêmeos monozigóticos e dizigóticos e a observação de que parentes em primeiro grau de pacientes com LES têm mais chances de desenvolver a doença fornecem indícios da influência genética na predisposição à doença (AMUR; PAREKH; MUMMANENI, 2012). Além disso, diversos genes têm sido associados com o desenvolvimento da doença, mostrando a forte influência genética no LES (REKVIG; VAN DER VLAG, 2014).

O LES geralmente resulta dos efeitos combinados de um grande número de genes, a maioria destes com funções relacionadas a resposta

imune (CRISPIM, et al., 2010; KUNZ, 2013) (). Cada gene é responsável por transcrever e traduzir determinadas proteínas que agem em diferentes funções. Assim, alterações podem gerar modificações na proteína, tanto com relação a sua composição e conformação, quanto considerando sua expressão e consequente desregulação do sistema imune.

Desde 1946, 140 genes foram associados com o desenvolvimento de LES (REKVIG; VAN DER VLAG, 2014). Os fatores genéticos mais conhecidos que contribuem com quase 15% para o surgimento do lúpus são os alelos dos *loci HLA* (ZHAI *et al.*, 2013), além de outros genes do complexo MHC (KUNZ, 2013). Ainda, genes como *STK17A* (FONSECA *et al.*, 2013), genes *TLR8* (ENEVOLD *et al.*, 2014), *CTLA-4* (ZHAI *et al.*, 2013) e *PTPN22* (OSTANEK *et al.*, 2014) também foram associados com LES.

## 1.6 GENE *PTPN22*

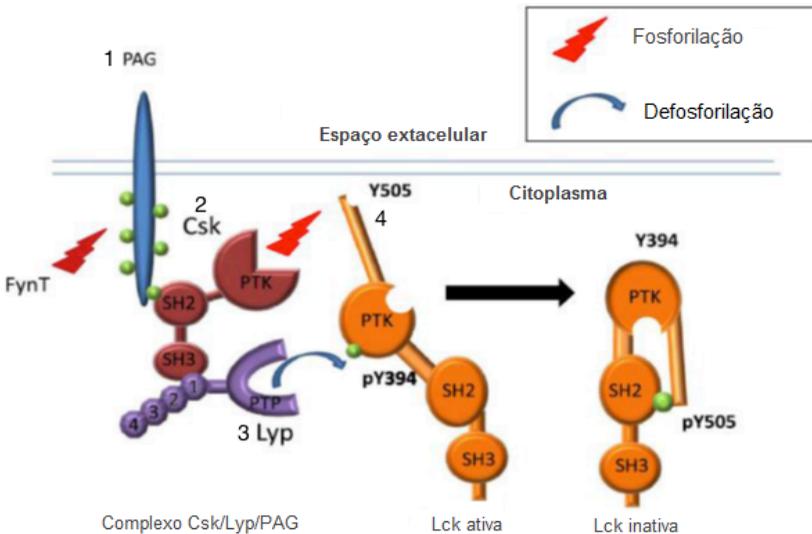
O gene *PTPN22* (gene ID: 26191) está associado a diversas doenças que possuem como característica a produção de autoanticorpos, como: diabetes tipo 1, artrite reumatoide e LES, em populações asiáticas e europeias (STANFORD; BOTTINI, 2014).

Este gene está localizado no cromossomo 1 (1p13.3-13.1) e codifica a proteína tirosina fosfatase (PTP), também chamada de Lyp (do inglês, *lymphoid tyrosine phosphatase*). Esta proteína está presente, exclusivamente, em células hematopoéticas e se localiza principalmente no citoplasma (BURN *et al.*, 2011; VANG *et al.*, 2007). Lyp é formada por um domínio N-terminal fosfatase e uma região C-terminal com muitos motivos ricos em prolina (P1-P4) (COHEN *et al.*, 1999). Existem 3 isoformas da Lyp (Lyp1-3), sendo a isoforma Lyp1 a mais abundante e bem estudada (WANG *et al.*, 2010).

### 1.6.1 LYP E REGULAÇÃO IMUNE

A principal função da Lyp1 é regular, dentro da célula, a sinalização celular, através da remoção de grupos fosfato dos resíduos de tirosina de proteínas (STANFORD; BOTTINI, 2014). A proteína Lyp interage com diversas moléculas intracelulares, principalmente com a proteína regulatória negativa Csk (do inglês, C-terminal Src kinase) durante a ativação dos linfócitos T (BURN *et al.*, 2011).

Lyp possui quatro motivos ricos em prolina (P1-P4) e através do primeiro domínio (P1) se liga ao domínio de homologia Src 3 (SH3) da Csk, gerando o complexo Lyp/Csk, que regula negativamente moléculas responsáveis pela ativação dos linfócitos T, como a cinase Lck (do inglês, lymphocyte-specific protein tyrosine kinase). O complexo Lyp/Csk desfosforila o resíduo ativatório pY394 enquanto que Csk fosforila o resíduo pY505 da Lck, que desta forma sofre uma mudança conformacional e formação de uma prega interna, a qual desativa a proteína (Figura 3). Uma vez inativada, Lck não pode fosforilar os resíduos de tirosina dos motivos de ativação baseados em tirosina (ITAMs, do inglês, Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), inibindo a sinalização do TCR (BURN et al., 2011).



**Figura 3.** Inativação de Lck (4) pela proteína Lyp (3). A proteína Lyp, pelo seu domínio rico em prolina (P1), interage com a região SH3 da Csk (2), que também interage com PAG (do inglês, *protein associated with GEMS*) (1) pela sua região SH2, formando assim o complexo Csk/Lyp/PAG. Esse complexo é fosforilado e desta forma a proteína Lyp desfosforila o resíduo ativatório pY394, e a Csk fosforila o resíduo Y505 da Lck. Assim, ocorre uma mudança conformacional em Lck, com formação de uma prega interna e consequentemente sua desativação.

**Fonte:** Adaptado de BURN et al. (2011).

Por controlar a sinalização dos linfócitos T, Lyp possui função muito importante na regulação do sistema imune. Em relação ao sistema imune adaptativo, ela inibe a ativação dos linfócitos T e contribui para a sinalização em diversos tipos de células, incluindo os linfócitos B. A deficiência de *PTPN22* pode gerar efeitos nos receptores de linfócitos B ou no desenvolvimento dessas células em ratos. Em humanos, polimorfismos no gene podem alterar a sinalização e repertório dos linfócitos B. Por outro lado, no sistema imune inato, Lyp promove seletivamente produção de IFN tipo I pelas células mieloides, por aumentar o padrão de sinalização de receptores (STANFORD; BOTTINI, 2014).

Experimentos com ratos *knock-down* de *PTPN22* e inibição farmacológica do gene levam ao aumento na sinalização de TCRs e aumento no número e hiper-reação dos linfócitos CD4+ e CD8+ com TCR ativado (HASEGAWA *et al.*, 2004; TURNER; KANE; MOREL, 2011). Lyp exerce função reguladora tanto em linfócitos T como em linfócitos Treg (FOUSTERI *et al.*, 2014).

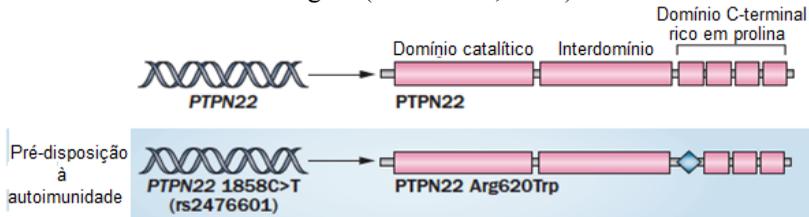
Ratos com *PTPN22* inativado apresentam linfócitos Treg em número elevado e com maior atividade supressiva e adesiva (BROWNLIE *et al.*, 2012). Contudo, sobre grande ativação dos TCRs, a falta de *PTPN22* reduz a indução de Treg. Independentemente, os estudos mostram que Lyp é fundamental no processo de ativação dos TCR de linfócitos Treg (FOUSTERI *et al.*, 2014).

Por possuir papel fundamental na sinalização dos linfócitos T, mutações no gene *PTPN22* podem gerar disfunções na proteína e desregulação imune. Contudo numerosos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP – do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) neste gene estão descritos, destaca-se o SNP não-sinônimo rs2476601 como um fator de risco para o LES (STANFORD; BOTTINI, 2014).

### 1.6.2 SNP rs2476601

O SNP rs2476601 resulta na transição de citosina (C) por timina (T) no nucleotídeo 1858 da região codificadora (C1858T) do gene *PTPN22*. Esse polimorfismo está localizado no códon 620, do éxon 14, e gera, na proteína, a substituição de um resíduo de arginina por um de triptofano (R620W) (BURN *et al.*, 2011) (Figura 4). Essa região, onde há a troca de aminoácido, está localizado justamente na região de interação entre Lyp e Csk (GREGERSEN; BEHRENS, 2006). Na presença do

aminoácido variante a proteína Lyp não se liga à cinase Csk tão efetivamente e a atividade enzimática intrínseca da Lyp é alterada, o que faz com que a sinalização do TCR seja prejudicada, afetando a resposta efetiva do sistema imunológico (CAO *et al.*, 2012).

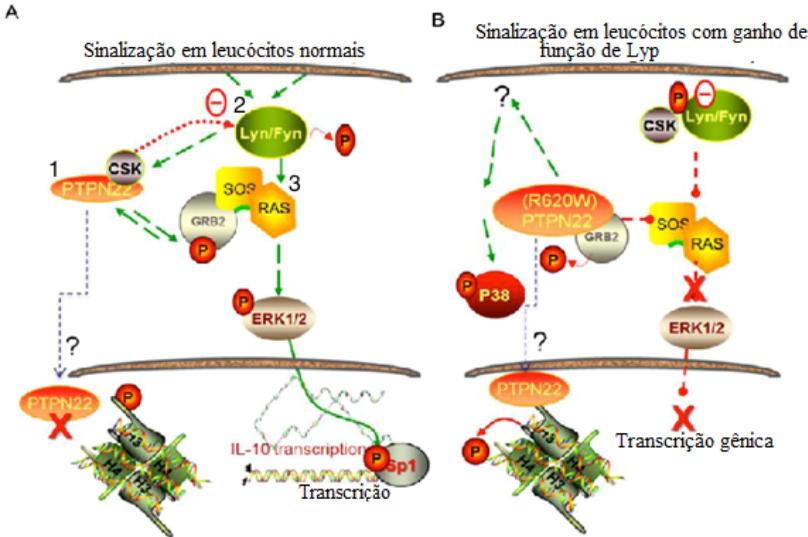


**Figura 4.** Variante C1858T do gene *PTPN22*.

A primeira parte da figura mostra o gene *PTPN22* com a forma selvagem da proteína (PTPN22-Lyp), a qual possui um domínio catalítico N-terminal, um domínio intermediário e um domínio C-terminal com 4 regiões ricas em prolina. A segunda parte da figura mostra o SNP C1858T do gene *PTPN22* que codifica a proteína Lyp variante Arg620Trg, que está associada com predisposição à autoimunidade.

**Fonte:** Adapado de STANFORD; BOTTINI (2014).

O efeito do polimorfismo C1858T em Lyp e, por consequência, na sinalização imune, é controverso. O polimorfismo pode gerar perda da função da proteína, uma vez que a mudança na conformação de Lyp preveniria a formação do complexo Lyp/Csk. Desta forma, a inibição da sinalização dos TCRs seria prejudicada (ZIKHERMAN *et al.*, 2009) e ocorreria uma hiperativação dos linfócitos T. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que uma correspondente murina da variante humana 620W, a Pep619W, possui uma meia-vida diminuída (ZHANG *et al.*, 2011). Em contraponto, a variante 620W em Lyp poderia representar um ganho de função proteica. Foi demonstrado que a variante gera uma fosfatase mais ativa e com maior efeito inibitório na sinalização dos linfócitos T (VANG *et al.*, 2005). A hipótese de ganho de função é apoiada pela observação de que pacientes com autoimunidade que possuem esse polimorfismo apresentaram menor atividade dos leucócitos (Figura 5) (CAO *et al.*, 2012).



**Figura 5.** Ganho de função da proteína variante PTPN22 (R620W). (A) PTPN22 (Lyp - 1) atua nas vias de sinalização de cinases da família Src (2), através da cinase CsK e nas vias RAS (3), através da ligação GRB-2. (B) Ganho de função- A proteína variante PTPN22 (620W) possui uma alteração no local de ligação à cinase CsK, impedindo a formação do complexo PTPN22/Csk. Assim, CsK não pode se ligar na Src e inibi-la. Além disso, ela pode atuar como antagonista e desfosforilar caudas de histonas, diminuir a ativação de ERK1/2 e Sp1 e atuar na retenção da sinalização do RAS, o que prejudicaria a ativação do linfócito.

**Fonte:** Adaptado de CAO *et al.* (2012).

Estudos mostram ainda que portadores da variante, comparados com pessoas com a forma selvagem da proteína, apresentam menor ativação dos TCRs (FIORILLO *et al.*, 2010), e linfócitos Treg com função reduzida (FOUSTERI *et al.*, 2014). O ganho de função da proteína faria com que os linfócitos T fossem inativados mais fortemente. Isto poderia influenciar no processo de seleção negativa, pois mesmo linfócitos que possuíssem afinidade exagerada com antígenos próprios passariam no processo de seleção no timo. A proteína Lyp com função intensificada também atrapalharia o funcionamento dos linfócitos Treg, pois estes seriam pouco ativados e não combateriam os linfócitos autorreativos na periferia dos órgãos linfoides (BOTTINI *et al.*, 2006).

Pela Lyp ser uma molécula fundamental no processo de ativação dos linfócitos e na resposta imune, a variante da proteína gerada pelo

polimorfismo C1858T do gene *PTPN22*, pode acarretar em desregulação do sistema imune e doenças relacionadas. A patogênese autoimune promovida pelo SNP C1858T deve, provavelmente, envolver a diferenciação de subgrupos de linfócitos T, o repertório de linfócitos B e o balanço entre produção de citocinas imunoregulatórias e pro-inflamatórias (STANFORD; BOTTINI, 2014).

## 2 JUSTIFICATIVA

Estima-se que no Brasil existam 65.000 pessoas afetadas com LES, sendo esta uma doença autoimune razoavelmente comum (SBR, 2014). O LES pode afetar fisicamente e mentalmente o paciente, acarretando prejuízo pessoal, profissional e social. Indivíduos com LES podem apresentar um decréscimo da produtividade de trabalho ou total incapacidade de exercê-lo, acarretando um considerável custo econômico ao país, devido à perda de mão de obra e gastos com os pacientes (PANOPALIS; CLARKE; YELIN, 2012).

O LES é uma doença complexa que apresenta sintomas muito heterogêneos. Para o estabelecimento do diagnóstico são analisados marcadores fisiológicos e aspectos clínicos, porém esse diagnóstico pode ser auxiliado por marcadores genéticos e assim permitir o encaminhamento dos pacientes a tratamentos adequados, prevenindo a evolução de formas graves da doença.

O gene *PTPN22* codifica a proteína Lyp, cuja função está intimamente ligada ao funcionamento do sistema imune. Esta proteína participa da ativação das células T e desta forma contribui para manutenção da homeostase do organismo. O polimorfismo C1858T (rs 2476601) do gene *PTPN22* pode interferir no funcionamento da proteína e contribuir para o aparecimento de LES.

Trabalhos anteriores mostraram associação desse polimorfismo com o desenvolvimento de LES (OROZCO *et al.*, 2005; GOMEZ *et al.*, 2005; LEA; LEE, 2011; ELIOPOLUS, 2012; OSTANEK *et al.*, 2014), evidenciando o gene *PTPN22* como um forte candidato a marcador genético para a doença. Porém, no Brasil ainda não foram publicados trabalhos que corroborem essa associação. PARENTE COSTA *et al.*, (2009) não encontraram associação do polimorfismo com o desenvolvimento de lúpus pediátrico. Desta forma, mais estudos devem ser realizados para averiguar se esse gene pode ser futuramente um marcador genético para o LES.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Verificar a associação do polimorfismo C1858T (R620W) (rs2476601) do gene *PTPN22* em pacientes com LES e em indivíduos saudáveis, em um estudo do tipo caso-controle, no estado de Santa Catarina.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo C1858T em amostras de pacientes com LES e indivíduos controles.
- Verificar qual a associação entre a presença do polimorfismo com o desenvolvimento da doença.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 ASPECTOS ÉTICOS**

Este trabalho faz parte de um projeto maior em vigência no Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE/CCB/UFSC) intitulado “Genética da autoimunidade: polimorfismos em Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatoide em pacientes de Santa Catarina”, aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC), nº 172/06, prorrogado pelo ofício nº 9/CEPSH/PRPE/11 até março de 2016. Os voluntários foram esclarecidos com relação à pesquisa e foram assegurados quanto ao sigilo das informações pessoais, assinando na sequência o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos A e B).

### **4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

O grupo amostral do presente estudo foi constituído por 382 indivíduos voluntários residentes no estado de Santa Catarina. O grupo de casos é composto por 155 pacientes diagnosticados com LES e atendidos no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU-UFSC), vinculado à Universidade Federal de Santa Catarina. O grupo controle é representado por 227 indivíduos saudáveis sem histórico de doença autoimune pessoal e/ou familiar. Casos e controles foram pareados por grupos de idade, gênero e etnia baseada em cor de pele. Os cálculos para averiguação da homogeneidade dos grupos foi feito por teste de Qui-quadrado usando o *software Social Science Statistics* (STANGROOM, 2014).

### **4.3 COLETA DE DADOS E MATERIAL BIOLÓGICO**

Os pacientes com LES foram encaminhados pela equipe do Hospital Universitário para a coleta de 10ml de sangue periférico. O sangue foi mantido em tubo Vacutainer® contendo anticoagulante EDTA. Os dados familiares e epidemiológicos foram obtidos através da aplicação de questionário (Anexo C), enquanto os dados clínicos foram extraídos dos prontuários médicos. Os voluntários saudáveis também preencheram um questionário para a obtenção de dados (Anexo D).

Em seguida, o sangue foi encaminhado ao LAPOGE para separação de seus constituintes, extração do DNA e genotipagem das amostras. Os dados familiares e epidemiológicos do questionário e prontuário foram armazenados no banco de dados do LAPOGE.

#### 4.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE E EXTRAÇÃO DO DNA

O sangue coletado foi centrifugado durante 20 minutos a 3.000 rotações por minuto (rpm) (centrifuga Fanem, Excelsa II\*, modelo 206 BL) para separação de seus constituintes: plasma que é armazenado para futuras pesquisas; camada de leucócitos ou *buffy coat*, para posterior extração do DNA genômico e hemácias. As amostras foram armazenadas a - 20°C no LAPOGE.

A partir do *buffy coat*, extrai-se o DNA genômico pela técnica de *salting-out* (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988). Após extração, as amostras de DNA foram catalogadas, incluídas no banco de dados do LAPOGE e diluídas a concentração de 20µg/ml, padrão do laboratório.

#### 4.5 GENOTIPAGEM *PTPN22*

A genotipagem do SNP *C1858T* (rs2476601) do gene *PTPN22* foi realizada através da amplificação do DNA e posterior identificação do polimorfismo pelo tamanho dos fragmentos gerados com o uso de enzima de restrição (RFLP– do inglês *Restriction fragment length polymorphism*).

##### 4.5.1 AMPLIFICAÇÃO DO DNA

O DNA foi amplificado através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados (Tabela 2) amplificaram um fragmento de 326 pares de bases (WAGENLEITER *et al.*, 2005). Para a realização da PCR foi preparado Mix com os reagentes descritos na Tabela 3. O programa de ciclagem para amplificação do gene *PTPN22* no termociclador está apresentado da Tabela 4.

**Tabela 2.** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCR para o polimorfismo rs2476601 do gene *PTPN22*.

Gene	Sequência dos iniciadores	Sequência de clivagem
	<i>Forward Primer</i>	
<i>PTPN22</i>	5'TGCCCATCCCACACTTTAT 3'	5'- GT▼AC- 3'
C1858T	<i>Reverse Primer</i>	
	5'ACCTCCTGGGTTTGTACCTTA 3'	3'- CA▲TG- 5'

**Fonte:** WAGENLEITER *et al.*, 2005.

**Tabela 3.** Mix de reagentes para a PCR para o polimorfismo rs2476601 do gene *PTPN22*.

Reagente	Quantidade
Água MiliQ	17,6 µl
Tampão 10X (200 mM de Tris-HCl, pH 8,4, 500mM KCl)	2,5µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,0µl
dNTP (desoxinucleotídeo trifosfatado) (10mM)	0,5µl
Primer Forward (15pmol/µl)	0,1µl
Primer Reverse (15pmol/µl)	0,1µl
<i>Taq</i> DNA Polimerase (5U/µl)	0,2 µl
DNA (20 ng/ µl).	3,0µl
Total	25,0µl

**Fonte:** Adaptado de WAGENLEITER *et al.*, 2005.

**Tabela 4.** Programa de ciclagem da PCR para o polimorfismo rs2476601 do gene *PTPN22*.

Passo	Temperatura	Tempo	Processo
1° passo	95°C	15 minutos	Pré-desnaturação
2° passo	94°C	1 minuto	Desnaturação
3° passo	55°C	1 minuto	Pareamento dos <i>primers</i>
4° passo	72°C	1 minuto	Extensão da cadeia
5° passo	Repetição do 2° ao 4° passo por 34 vezes		
6° passo	72°C	10 minutos	Extensão final da cadeia

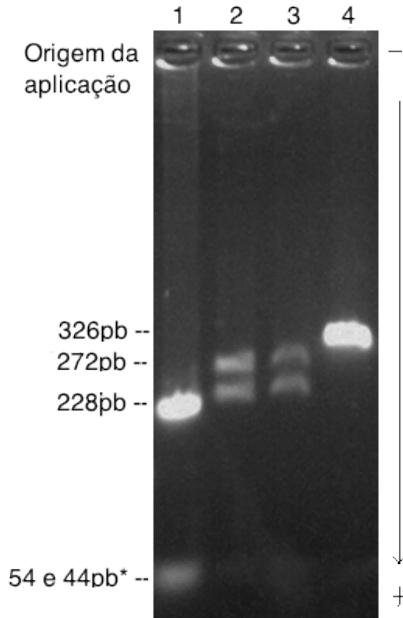
**Fonte:** adaptado de WAGENLEITER *et al.*, 2005.

#### 4.5.2 DIGESTÃO DAS AMOSTRAS E ELETROFORESE

Após a reação de PCR foi realizada a digestão dos produtos através da endonuclease de restrição *Rsal* (2,5U, *New England Biolabs*, Inc.). O fragmento de 326pb gerado pela PCR possui dois sítios de restrição onde a endonuclease pode se acoplar e cortar o fragmento em diferentes tamanhos. Se o fragmento possui o alelo C do polimorfismo estudado ele é cortado em três fragmentos menores (228, 54 e 44pb). Por outro lado, se o fragmento possui o alelo T ele é cortado em dois fragmentos (272 e 54pb) (WAGENLEITER *et al.*, 2005).

Para a digestão foi utilizado 8,0µl do produto de PCR; 0,5 unidades de endonuclease de restrição; 5,0µl de água ultra-pura e 1,5µl do tampão da enzima (NEB 1) mantido em banho-maria à temperatura de 37°C de um dia para outro (*overnight*) (WAGENLEITER *et al.*, 2005).

Após o processo de digestão, foi realizada eletroforese dos produtos em gel de agarose 2,5%, que foram corados com *Gel Red* para análise dos genótipos. Os géis foram visualizados em fotodocumentador *DNR Bio-Imaging Systems MiniBIS Pro*® através do *software GelCapture*™. O tamanho dos fragmentos gerados foi o parâmetro utilizado para identificar os genótipos. O genótipo selvagem (CC) apresenta os fragmentos de 228, 54 e 44pb como produto de amplificação, enquanto que o homocigoto variante (TT) possui os fragmentos de 272 e 54pb. O genótipo heterocigoto (CT) corresponde às bandas de 272, 228, 54 e 44pb (Figura 6).



**Figura 6.** Genotipagem do polimorfismo rs2476601 do gene *PTPN22*.

Gel de agarose 2,5%. Foram aplicadas 4 amostras, sendo a de número 4 correspondente ao produto de PCR (326pb), sem aplicação da enzima de restrição. A amostra 1 corresponde ao genótipo CC, por apresentar uma banda de 228pb e mais uma banda, que se refere a dois fragmentos que se sobrepõem (54 e 44pb, respectivamente), não sendo distinguidas no gel. As amostras 2 e 3 correspondem ao genótipo CT, por apresentarem 2 bandas (272pb e 228pb) e a banda com os mesmos dois fragmentos de 54 e 44pb.

**Fonte:** LUZIETTI L S., 2014.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas de pacientes e controles foram calculadas por contagem direta. As amostras foram analisadas a partir dos testes de homogeneidade (Qui-quadrado de homogeneidade) e do teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) através do *software* Genepop (RAYMOND; ROUSSET, 1995). A verificação da possível associação dos genótipos à doença foi realizada a partir do teste *Odds Ratio* (OR), com intervalo de confiança (IC) de 95%, através do *software* EpiMax Table Calculator (HEALTH DECISION STRATEGIES, 2013). Valores de OR iguais a 1 significam que o fator não é associado à doença em

questão. Valores maiores do que 1 indicam maior probabilidade de desenvolvimento a doença, enquanto que valores menores do que 1 apontam para uma certa proteção, conferida pelo fator estudado ou por um outro fator ligado ao primeiro. O limite de significância estabelecido para todos os testes foi de  $p \leq 0,05$ .

#### **4.6.1 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO COM MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS**

Para análise da possível associação de manifestações clínicas com o polimorfismo estudado, foram utilizados todos os pacientes para os quais esses dados estivessem disponíveis no prontuário ou no questionário realizado. A seleção dos dados clínicos que foram analisados se baseou na presença destes em estudos publicados e na quantidade de pacientes que tinham dados disponíveis para análise de cada sintoma, sendo selecionados os sintomas com maior número de dados disponíveis. Ao todo 151 pacientes possuíam dados clínicos para determinadas manifestações clínicas e genotipagem disponível.

#### **4.6.2 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E GENOTÍPICA**

Foram selecionados 127 pacientes e 202 controles que possuíam dados de histórico tabagista disponíveis no banco de dados do LAPOGE para verificar a ocorrência da associação do hábito tabagista com desenvolvimento de LES. Os indivíduos foram separados em 3 grupos: 1) fumantes (pelo menos 1 cigarro por mês por no mínimo 3 meses consecutivos contando a data da entrevista); 2) ex-fumante (não fuma há mais de 1 ano contando a data da entrevista); 3) não fumantes. Foram excluídos indivíduos com menos de 18 e mais de 65 anos e pacientes com menos de um ano de diagnóstico (GHAUSSY *et al.*, 2003).

Posteriormente, foram agrupados os indivíduos que possuíam dados de histórico tabagista disponível e genotipagem realizada para o polimorfismo C1858T do gene *PTPN22*. Os dois fatores foram analisados em conjunto.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

O teste de homogeneidade do Qui-quadrado mostra que casos e controles são equivalentes com relação aos 3 dados epidemiológicos, gênero, etnia e idade (Tabela 5).

**Tabela 5.** Classificação das amostras de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (casos) e de indivíduos sem a doença (controles) quanto à distribuição de gênero, etnia, e à idade média dos indivíduos amostrados. Os valores de  $p$  foram obtidos através de testes de homogeneidade entre as duas amostras para tais parâmetros.

Dados Epidemiológicos	Casos n=155 (%)	Controles n= 227 (%)	Grau de confiança
<b>Gênero</b>			
Feminino	150 (96,77%)	213 (93,83%)	$p=0,194$
Masculino	5 (3,23%)	14 (6,17%)	
<b>Etnia</b>			
Eurodescendente	127 (81,94%)	187 (82,40%)	$p=0,648$
Afrodescendente	23 (14,84%)	29 (12,76%)	
Ameríndio-descendente	5 (3,22%)	11 (4,84%)	
<b>Idade</b>			
(Média $\pm$ SD)	37,83 $\pm$ 12,05	39,99 $\pm$ 14,66	-

n: número amostral; %: porcentagem; Média: idade média de cada amostra, em anos; SD: desvio padrão da média;  $p$ =probabilidade do teste qui-quadrado.

As amostras de casos e controles mostram-se homogêneas quanto à distribuição em gênero ( $\chi^2=1,686$ ,  $p=0,194$ ), sendo o sexo feminino prevalente em casos e controles. Quanto à distribuição étnica, os dois grupos (casos e controles) são homogêneos ( $\chi^2=0,867$ ,  $p=0,648$ ) e são considerados triíbridos, sendo o componente europeu o mais frequente. A idade média dos grupos é equivalente, pois o desvio padrão das idades médias se sobrepõe. Assim, infere-se que os grupos possuem a mesma proporção estatística para gênero, etnia e idade média. (CALLEGARI-JACQUES, 2003). A uniformidade entre os dois grandes grupos oferece maior confiabilidade para que casos e controles sejam geneticamente comparados, e desta forma, analisar se a presença do polimorfismo rs2476601 confere predisposição ao desenvolvimento do LES.

### 5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

### 5.2.1 EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

Em casos e controles, as distribuições das frequências do polimorfismo C1858T do gene *PTPN22* estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p_{\text{casos}} = 0,379$ ;  $p_{\text{controles}} = 0,445$ ).

### 5.2.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS, GENOTÍPICAS E ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO COM LES

A Tabela 6 mostra as frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo C1858T do gene *PTPN22* em casos e controles e a diferenciação nas suas distribuições em cada grupo.

**Tabela 6.** Distribuição das frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo C1858T do gene *PTPN22* em pacientes e controles do estado de Santa Catarina.

	<b>Casos n (%)</b>	<b>Controles n (%)</b>	<b>p</b>
<b>Genótipos</b>			
TT	3 (1,94%)	1 (0,44%)	0,008*
TC	27 (17,41%)	21 (9,25%)	
CC	125 (80,65%)	205 (90,31%)	
<b>Total</b>	<b>155</b>	<b>227</b>	
<b>Alelos</b>			
T	33 (10,65%)	23 (5,07%)	0,003*
C	277 (89,35%)	431 (94,93%)	
<b>Total</b>	<b>310</b>	<b>454</b>	

n: número amostral; p: probabilidade. \* =  $p < 0,05$

As diferenças encontradas na distribuição dos genótipos e dos alelos entre casos e controles mostram-se significativas ( $\chi^2 = 9,55905$ ,  $p = 0,008$  e  $\chi^2 = 11,37976$ ,  $p = 0,003$ , respectivamente), indicando que casos e controles possuem diferenças na distribuição dos genótipos e alelos e que o polimorfismo não está equilibrado entre os dois grupos. Resultados equivalentes foram encontrados por Reddy et al. (2005) (alelos:  $\chi^2 = 11,2895$ ;  $p = 0,0007$ / genótipos:  $\chi^2 = 10,2243$ ;  $p = 0,0013$ ) (REDDY et al., 2005).

Os cálculos de associação (OR) estão presentes na Tabela 7.

**Tabela 7.** Cálculos de associação (OR), valores de  $p$  e intervalo de confiança (IC, 95%) para casos e controles em relação à presença ou ausência do alelo T do polimorfismo C1858T do gene *PTPN22*.

	<b>Casos n (%)</b>	<b>Controles n (%)</b>	<b>OR</b>	<b><math>p</math></b>	<b>IC</b>
<b>Presença de T x ausência</b>					
TT + TC	30 (19,0%)	22 (9,7%)	2,236	0,011*	1,189- 4,221
CC	125 (81,0%)	205 (90,3%)			
<b>Total</b>	<b>155</b>	<b>227</b>			
<b>Genótipos CT x CC</b>					
CT	27 (17,8%)	21 (9,3%)	2,109	0,023*	1,097- 4,064
CC	125 (82,2%)	205 (90,7%)			
<b>Total</b>	<b>152</b>	<b>226</b>			
<b>Genótipos TT x CC</b>					
TT	3 (2,3%)	1 (0,5%)	4,920	0,317	0,452- 121,975
CC	125 (97,7%)	205 (99,5%)			
<b>Total</b>	<b>128</b>	<b>206</b>			

n: número amostral; OR: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confiança;  $p$ : probabilidade. \* =  $p < 0,05$ .

No atual estudo, a presença do alelo T do polimorfismo rs2476601 do gene *PTPN22* mostra-se associada com o desenvolvimento de LES (OR=2,236;  $p$ =0,011; IC95%=1,189- 4,221). Esse resultado é consistente com estudos prévios realizados em outros países como Espanha (OROZCO *et al.*, 2005), Grécia (ELIOPOLUS, 2012), Polônia (OSTANEK *et al.*, 2014) e Colômbia (GOMEZ *et al.*, 2005), assim como estudos de meta-análise em diferentes populações (LEA; LEE, 2011). Contudo, um estudo realizado no Brasil com lúpus pediátrico não encontrou associação deste polimorfismo com a doença, não concordando com os resultados do presente estudo (PARENTE COSTA *et al.*, 2009). A não significância desses resultados pode ter sido ocasionada pelo tamanho amostral do trabalho anterior (58 casos e 111 controles).

Um estudo realizado nos Estados Unidos também mostrou associação do polimorfismo com LES, porém, diferentemente do presente trabalho, os grupos étnicos foram analisados separadamente. A etnia foi estabelecida por autodenominação e cada grupo foi analisado para ocorrência de possíveis associações com polimorfismos do gene

*PTPN22*. O trabalho encontrou intensa associação do polimorfismo rs2476601 com LES em indivíduos eurodescendentes (OR=1,40;  $p=4,7 \times 10^{-9}$ ), mas não em indivíduos hispânicodescendentes (OR=1,2;  $p=0,1988$ ). Em asiáticos e afrodescendentes o polimorfismo se mostrou equilibrado entre pacientes e controles (NAMJOU *et al.*, 2013). Em nosso trabalho, todas as etnias foram agrupadas em uma única amostra e apresentam frequências diferentes tanto em casos como em controles (Tabela 5). A grande maioria dos indivíduos amostrados ( $n=214$ ; 82,2%) é eurodescendente, o que pode ter influenciado a associação encontrada no presente estudo, já que diferentes grupos geográficos (etnias) respondem diferentemente à suscetibilidade do gene à doença (KAWASAKI *et al.*, 2006) e o grupo de eurodescendentes parece ser o mais suscetível (LEA; LEE, 2011).

Excluindo indivíduos homocigotos TT e comparando aqueles de genótipo CT com os de genótipo CC (modelo de comparação de heterocigoto), os resultados mostram que o genótipo heterocigoto CT confere o dobro de chance do indivíduo de desenvolver LES (OR= 2,109;  $p=0,023$ ; IC95%= 1,097-4,064). Esta associação significativa apoia resultados encontrados em outros estudos com o gene *PTPN22* (KAUFMAN *et al.*, 2006; REDDY *et al.*, 2005), mesmo naqueles com pequeno número amostral (40 casos e 20 controles), indicando que o alelo T do polimorfismo, mesmo em dose simples, pode estar envolvido no surgimento da doença (MOEZ; SOLIMAN, 2012). A associação da presença do alelo T do polimorfismo rs2476601 do gene *PTPN22* com LES neste e em outros trabalhos (LEE *et al.*, 2007; VANG *et al.*, 2007; BURN *et al.*, 2011) é um grande indício da importância deste gene para a manutenção da homeostase do sistema imune. O gene *PTPN22* possui função essencial para a regulação dos linfócitos T e do sistema imunológico, desta forma, o polimorfismo rs2476601, que promove uma diferenciação na proteína Lyp, pode contribuir para o desenvolvimento de LES e outras doenças autoimunes (CHUNG *et al.*, 2011; OSTANEK *et al.*, 2014; STANFORD; BOTTINI, 2014).

Excluindo indivíduos heterocigotos e comparando casos e controles de genótipos TT e CC, não é encontrada associação entre o genótipo TT com o desenvolvimento de LES (OR= 4,920;  $p=0,317$ ; IC95%= 0,452-121,975). A falta de associação encontrada pode ter sido ocasionada pelo tamanho amostral pequeno de indivíduos com o genótipo TT ( $n_{\text{casos}}=3$ ,  $n_{\text{controles}}=1$ ), já que os resultados anteriores mostram associação do alelo T com LES.

Associações deste polimorfismo foram encontradas com artrite reumatoide (SALAMA *et al.*, 2014), diabetes tipo I (DONG *et al.*, 2014) e doença de Graves (ZHEBRUN *et al.*, 2011). Outros polimorfismos do mesmo gene também foram associados com doenças autoimunes, como o polimorfismo rs2488457 que foi associado com espondilite anquilosante (HUANG *et al.*, 2014) e Vogt-Koyanai-Hrada (ZHANG *et al.*, 2014), e o polimorfismo rs3765598, associado com LES (NAMJOU *et al.*, 2013). Na Tabela 8, são apontados artigos com estudos de associação de polimorfismos do gene *PTPN22* com doenças autoimunes, que contribuíram para a revisão teórica deste trabalho.

**Tabela 8.** Revisão de estudos de associação com polimorfismo do gene *PTPN22* com doenças autoimunes.

Autor (ano)	Polimorfismo	Doença	Local do estudo	Número amostral (casos/controles)
<b>Trabalhos onde foi encontrada associação de polimorfismos do gene <i>PTPN22</i> com doenças autoimunes</b>				
HUANG <i>et al.</i> (2014)	rs2488457	Espongilite anquilosante	Taiwan	391/ 391
ZHANG <i>et al.</i> (2014)	rs2488457	Vogt-Koyanagi-Harada	China	1005/2010
SALAMA <i>et al.</i> (2014)	rs2476601*	Artrite reumatoide	Egito	112/122
DONG <i>et al.</i> (2014)	rs2476601*	Diabetes tipo I	Europa e Ásia	Meta-análise (1088/4079)
OSTANEK <i>et al.</i> (2014)	rs2476601*	LES	Polônia	135/201
	rs2476601*	LES	EUA (ed)* <sup>1</sup>	3936/3491
NAMJOU <i>et al.</i> (2013)	rs1217414	LES	EUA (ed)	3936/3491
	rs3765598	LES	EUA (hd)* <sup>2</sup>	1492/807
ELIOPOLUS (2011)	rs2476601*	LES	Grécia	328/427
MOEZ; SOLIMAN (2012)	rs2476601*	LES	Egito	40/20
	rs2476601*	Diabetes tipo 1	Rússia	150/200
ZHEBRUN <i>et al.</i> (2011)		Doença de Graves	Rússia	171/200
		LES	Europa (ed, hd, ad)* <sup>1,2,3</sup>	Meta-análise (7196/12978)
LEA; LEE (2011)	rs2476601*	LES	Europa	5579/5392
RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ <i>et al.</i> (2011)	rs2476601*	Artrite reumatoide	Europa	5579/5392
	rs33996649	Artrite reumatoide	Europa	5579/5392
COSTENBADER <i>et al.</i> (2008)	rs2476601*	Artrite reumatoide	Europa	437/437
MAJORCZYK <i>et al.</i> (2007)	rs2476601*	Artrite reumatoide	Polônia	173/543
KAUFMAN <i>et al.</i> (2006)	rs2476601*	LES	EUA	1680/1467
OROZCO <i>et al.</i> (2005)	rs2476601*	LES	Espanha	338/1036

Autor (ano)	Polimorfismo	Doença	Local do estudo	Número amostral (casos/controles)
<b>Trabalhos onde foi encontrada associação de polimorfismos do gene <i>PTPN22</i> com doenças autoimunes</b>				
REDDY <i>et al.</i> (2005)	rs2476601*	LES	Suécia	571/1041
GOMEZ <i>et al.</i> (2005)	rs2476601*	LES	Colômbia	143/308
		Síndrome de Sjogrens	Colômbia	70/308
		Diabetes tipo 1	Colômbia	110/308
<b>Trabalhos onde não foi encontrada associação de polimorfismos do gene <i>PTPN22</i> com doenças autoimunes</b>				
ZHANG <i>et al.</i> (2014)	rs2488457	Espongilite anquilosante	China	302/2010
	rs1310182	Vogt-Koyanagi-Harada	China	1005/2010
		Espongilite anquilosante	China	302/2010
	rs3789604	Vogt-Koyanagi-Harada	China	1005/2010
		Espongilite anquilosante	China	302/2010
NAMJOU <i>et al.</i> (2013)	rs2476601*	LES	EUA (ad)	1527/1811
	rs3765598	LES	EUA (ad)	1527/1811
ELIOPOLUS (2011)	rs2476601*	Artrite reumatoide	Grécia	378/430
ZHEBRUN <i>et al.</i> (2011)	rs2476601*	Artrite reumatoide	Rússia	121/200
ZERVOU <i>et al.</i> (2011)	rs2476601*	LES	Turquia	158/155
CHABCHOUB <i>et al.</i> (2009)	rs2476601*	Artrite reumatoide	Tunísia	150/236
		D. autoimune da tireoide	Tunísia	204/236
PARENTE COSTA <i>et al.</i> (2009)	rs2476601*	LES	Brasil	58/111
WU <i>et al.</i> (2005)	rs2476601*	LES	Euro-descendente	2689 indivíduos (estudo familiar)
GOMEZ <i>et al.</i> (2005)	rs2476601*	Artrite reumatoide	Colômbia	298/308

\* rs2476601: polimorfismo estudado no presente trabalho; ed: euro-descendente; hd: hispânico-descendente; ad: afrodescendente.

Dentre os vários polimorfismos do gene, o polimorfismo rs2476601, analisado neste trabalho, é o mais bem estudado e associado com doenças autoimunes e LES (KAWASAKI *et al.*, 2006; NAMJOU *et al.*, 2013). Porém, nem todos os estudos mostram associação do mesmo com a doença (WU *et al.*, 2005; ZERVOU *et al.*, 2011). Esta disparidade de resultados pode se dever a variação da frequência do polimorfismo, que é mais frequente em europeus e hispânicos e menos frequente em africanos e afrodescendentes (CHABCHOUB *et al.*, 2009; LEA; LEE, 2011), assim como a diferença na incidência de lúpus entre algumas etnias, sendo mais presente em africanos (KUNZ, 2013). Os diferentes resultados também podem ter sofrido influência dos desenhos amostrais dos estudos. Kaufman *et al.* (2006) propõe que o alelo T do polimorfismo esteja fortemente associado com lúpus familiar, mas não com lúpus esporádico. Entretanto, tanto o presente quanto estudos anteriores (LEA; LEE, 2011; OSTANEK *et al.*, 2014) não apoiam essa hipótese, já que foi encontrada associação do polimorfismo em lúpus esporádico.

### 5.2.3 FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ANÁLISES DE ASSOCIAÇÕES SINTOMÁTICAS

Os sintomas com maior quantidade de dados disponíveis, que foram utilizados para fazer as análises epidemiológicas com o polimorfismo foram: nefrite, anemia, leucopenia, trombocitopenia e artrite. As análises estatísticas das manifestações clínicas e dos genótipos dos pacientes são mostradas na Tabela 9.

**Tabela 9.** Cálculos de associação (OR), valores de  $p$  e intervalo de confiança (IC, 95%) para pacientes com ou sem diferentes manifestações clínicas em relação à presença ou ausência do alelo T do polimorfismo C1858T do gene *PTPN22*.

Manifestações clínicas n=151			Genótipo		OR	p	IC
			CT + TT n (%)	CC n (%)			
<b>Nefrite</b>							
Pacientes com nefrite (n=63)			9 (%)	54 (%)	0,605	0,354	0,232- 1,554
Pacientes sem nefrite (n=88)			19 (%)	69 (%)			
<b>Anemia</b>							
Pacientes com anemia (n=58)			10 (%)	48 (%)	0,868	0,913	0,339- 2,195
Pacientes sem anemia (n=93)			18 (%)	75 (%)			
<b>Leucopenia</b>							
Pacientes com leucopenia (n=30)			4 (%)	26 (%)	0,622	0,577	0,166- 2,124
Pacientes sem leucopenia (n=121)			24 (%)	97 (%)			
<b>Trombocitopenia</b>							
Pacientes com trombocitopenia (n=22)			4 (%)	18 (%)	0,972	1,000	0,252- 3,445
Pacientes sem trombocitopenia (n=129)			24 (%)	105 (8%)			
<b>Artrite</b>							
Pacientes com artrite (n=112)			20 (%)	92 (%)	0,842	0,898	0,311- 2,328
Pacientes sem artrite (n=39)			8 (%)	31 (%)			

n: número amostral; OR: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confiança;  $p$ : probabilidade.

Dentre todos os sintomas analisados, nenhum apresenta associação significativa com o polimorfismo (valores de  $p > 0,05$ ). Esses resultados são consistentes com trabalhos prévios que também não encontraram associações significativas do polimorfismo com sintomas de LES, como nefrite (OROZCO *et al.*, 2005), artrite (OSTANEK *et al.*, 2014), autoanticorpos antinucleares (MOEZ; SOLIMAN, 2012), anti-DNA, leucopenia, trombocitopenia e linfopenia (OSTANEK *et al.*, 2014).

Por outro lado, Moez & Soliman (2012) mostraram associação do genótipo CT com envolvimento renal em pacientes com LES (CC n=19; CT n =21;  $OR = 4,4$ ,  $p= 0,028$ ;  $IC95\% = 1,13-16,95$ ), mesmo com um número amostral não muito alto. Envolvimento renal é, assim, a manifestação clínica mais bem associada com o polimorfismo em pacientes de LES (REDDY *et al.*, 2005; MOEZ; SOLIMAN, 2012; SILVA *et al.*, 2014). Outros estudos também mostram associações com outras manifestações, como presença de anticorpos anti-fosfolípidios (CC n=81; CT+TT n=54;  $p=0,03$ ;  $IC95\% = 1,07-4,44$ ) (OSTANEK *et al.*, 2014) e desenvolvimento de doença autoimune da tireoide (C n = 90; n T= 18;  $OR=2,16$ ;  $p= 0,008$ ;  $IC95\% = 1,25-3,72$ ) (WU *et al.*, 2005) com o polimorfismo.

Da mesma forma que o alelo T do polimorfismo C1858T do gene *PTPN22* deve estar associado com o desenvolvimento de LES, este pode influenciar na progressão e gravidade da doença, favorecendo alguns sintomas (MOEZ; SOLIMAN, 2012; SILVA *et al.*, 2014). Porém, em concordância com trabalhos prévios (OROZCO *et al.*, 2005; OSTANEK *et al.*, 2014), os resultados do presente estudo mostram que não há associação do mesmo com manifestações clínicas. A falta de associação pode-se ser devida à baixa frequência dos alelos e ao pequeno número amostral. Desta forma, mais trabalhos, com maior número amostral, podem ser feitos para verificar o envolvimento do alelo com a gravidade da doença e desenvolvimento de sintomas característicos.

#### 5.2.4 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

Em relação ao histórico tabagista, 127 pacientes e 202 controles os quais possuíam dados de histórico tabagista disponíveis. As frequências deste dado epidemiológico e os cálculos de associação são mostrados na Tabela 10.

**Tabela 10.** Cálculos de associação (*OR*), valores de *p* e intervalo de confiança (IC, 95%) para casos e controles em relação ao hábito tabagista.

Hábito tabagista	Casos n (%)	Controles n (%)	<i>OR</i>	<i>p</i>	IC
Fumante	39 (33,3%)	30 (18,4%)	2,217	0,007*	1,232-3,997
Não fumante	78 (66,7%)	133 (81,6%)			
<b>Total</b>	117	163			
Fumante +	49 (38,6%)	69 (34,2%)	1,211	0,486	0,744-1,970
Ex-fumante	78 (61,4%)	133 (65,8%)			
<b>Total</b>	127	202			

n: número amostral; *OR*: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade. \* =  $p < 0,05$ .

Na comparação de fumantes com pessoas que nunca fumaram, o hábito tabagista dobra a chance do indivíduo desenvolver LES ( $OR=2,217$ ;  $p=0,007$ ;  $IC95\%= 1,232-3,997$ ). Este resultado concorda com estudos prévios que já encontraram associação do fumo com LES (COSTENBADER *et al.*, 2004; KIYOHARA *et al.*, 2012; TAKVORIAN; MEROLA; COSTENBADER, 2014), embora alguns trabalhos não tenham encontrado esta associação (BENGTSSON *et al.*, 2002; FORMICA *et al.*, 2003).

Ao agrupar as classes de fumantes e ex-fumantes, o hábito tabagista não mostra favorecer o desenvolvimento de LES ( $OR=1,211$ ;  $p=0,486$ ;  $IC95\%= 0,744-1,970$ ). Em trabalhos prévios, foi observado que pessoas que pararam de fumar têm menos chance de desenvolver a doença que atuais fumantes (MAK; TAY, 2014; TAKVORIAN; MEROLA; COSTENBADER, 2014) ou que ex-fumantes não são associados à doença (COSTENBADER *et al.*, 2004), concordando com nossos resultados.

É conhecido que fatores ambientais, incluindo o cigarro, contribuem no desenvolvimento de LES (KUNZ, 2013). O cigarro possui substâncias tóxicas que podem desregular ou desencadear as respostas imunes do organismo (MAK; TAY, 2014).

### 5.2.5 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E GENOTÍPICA

Ao selecionar indivíduos que possuíam dados de histórico tabagista e genotipagem do polimorfismo rs2476601 disponíveis, 97 pacientes e 117 controles foram analisados. As frequências de fumantes com

presença do alelo T, fumantes sem o alelo T, não fumantes com presença do alelo T e de não fumantes sem o alelo T, assim como os cálculos de associação, são mostrados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Cálculos de associação (*OR*), valores de *p* e intervalo de confiança (IC, 95%) para casos e controles em relação ao hábito tabagista e à presença ou ausência do alelo T do polimorfismo C1858T do gene *PTPN22*.

<b>Tabagismo + Genótipo</b>	<b>Casos n</b>	<b>Controles n</b>	<b>OR</b>	<b>p</b>	<b>IC</b>
Fumante (TT+CT)	7	1			
Fumante (CC)	24	16	5,333	0,221	0,544- 125,021
Não fumante (TT+CT)	12	15	8,750	0,081	0,837- 213,429
Não fumante (CC)	54	85	11,019	0,019*	1,301- 248,790
<b>Total</b>	<b>97</b>	<b>117</b>			

n: número amostral; *OR*: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confiança; *p*: probabilidade. \* =  $p < 0,05$ .

Quando o hábito tabagista é analisado juntamente com os genótipos, pode-se notar que indivíduos que fumam e possuem o alelo T do polimorfismo rs2476601 do gene *PTPN22* possuem uma chance muito maior de desenvolver a doença, se comparados com pessoas que nunca fumaram e possuem o alelo C do polimorfismo ( $OR=11,019$ ;  $p=0,019$ ;  $IC95\%= 1,301-248,790$ ). Quando foi analisado apenas o genótipo, indivíduos que possuíam o alelo T do polimorfismo apresentaram o dobro de chance de desenvolver LES ( $OR=2,236$ ;  $p=0,011$ ), assim como quando foi analisado somente o hábito tabagista ( $OR=2,217$ ;  $p=0,007$ ). Porém quando unimos os dois fatores a chance de desenvolver a doença sobe para mais de 10 vezes e o intervalo de confiança apresenta uma amplitude muito grande, o que significa que existe uma grande probabilidade desses resultados serem repetidos e que eles possuem alta confiabilidade.

Esses resultados corroboram com a ideia de que o desenvolvimento de LES possui influências genéticas e ambientais, pois nenhum dos dois fatores sozinho é suficiente para causar o lúpus. A atuação de fatores externos, como o hábito tabagista, aumenta a chance de indivíduos geneticamente pré-dispostos ao LES, desenvolvam a doença LES (MAK; TAY, 2014).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir, com base nos resultados obtidos neste estudo que:

- Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é associado com a presença do alelo T do polimorfismo C1858T do gene *PTPN22* (rs2476601) na população de Santa Catarina, Brasil.
- O polimorfismo rs2476601 não mostrou associação com o desenvolvimento de manifestações clínicas de LES, tais como: nefrite, anemia, leucopenia, trombocitopenia e artrite.
- O hábito tabagista mostrou associação com o desenvolvimento de LES.
- A presença do alelo T do polimorfismo rs2476601 juntamente com o hábito tabagista se mostraram associados ao desenvolvimento de LES.

## 7 PERSPECTIVAS

Os resultados desse estudo mostraram associação do hábito tabagista com LES, assim como associação do polimorfismo rs246601 do gene *PTPN22* com a doença, porém não com suas manifestações clínicas. Esses resultados concordaram com trabalhos prévios, porém vão de encontro a outros resultados encontrados no Brasil. Os fatores que levam essas discrepâncias, como a diversidade étnica entre as populações dos estudos, devem ser levados em consideração. Além disso, outros estudos de associação entre o polimorfismo, LES e suas manifestações clínicas devem ser realizados para um melhor entendimento do envolvimento do gene *PTPN22* no aparecimento e gravidade da doença. Desta forma este gene pode passar a ser ou não estabelecido como um marcador genético para a doença ajudando no diagnóstico e prevenção e melhorando a qualidade de vida de pacientes.

**8 REFERÊNCIAS:**

ALONSO-PEREZ, E *et al.* Lack of replication of higher genetic risk load in men than in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*, v. 16, n. 3, p. R128, 2014.

AMUR, S; PAREKH, A; MUMMANENI, P. Sex differences and genomics in autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity*, v. 38, n. 2-3, p. J254–65, 2012.

BALLESTAR, E; ESTELLER, M; RICHARDSON, B C. The Epigenetic Face of Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Immunology*, v. 176, n. 12, p. 7143–7147, 2006.

BENGTSSON, A A *et al.* Risk factors for developing systemic lupus erythematosus: a case – control study in southern Sweden. *Rheumatology*, p. 563–571, 2002.

BORBA, E F *et al.* Consenso de Lúpus Eritematoso Sistêmico Consensus of Systemic Lupus Erythematosus. v. 55, n. 1, p. 196–207, 2008.

BOTTINI, N *et al.* Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Seminars in immunology*, v. 18, n. 4, p. 207–13, 2006.

BROWNLIE, R J *et al.* Lack of the phosphatase PTPN22 increases adhesion of murine regulatory T cells to improve their immunosuppressive function. *Science signaling*, v. 5, n. 252, p. ra87, 2012.

BURN, G L *et al.* Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? *FEBS letters*, v. 585, n. 23, p. 3689–98, 2011.

CALLEGARI-JACQUES, S M. Bioestatística: princípios e aplicações. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 129- 143, 123 p, 2003.

CAO, Y *et al.* High basal activity of the PTPN22 gain-of-function variant blunts leukocyte responsiveness negatively affecting IL-10 production in ANCA vasculitis. *PLoS one*, v. 7, n. 8, p. e42783, 2012.

CAPPIONE III, A C *et al.* Germinal center exclusion of autoreactive B cells is defective in human systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation*, v. 115, n. 11, 2005.

CHABCHOUB, G *et al.* The R620W polymorphism of the protein tyrosine phosphatase 22 gene in autoimmune thyroid diseases and rheumatoid arthritis in the Tunisian population. *Annals of human biology*, v. 36, n. 3, p. 342–9, 2009.

CHUNG, S A *et al.* Differential genetic associations for systemic lupus erythematosus based on anti-dsDNA autoantibody production. *PLoS genetics*, v. 7, n. 3, p. e1001323, 2011.

COHEN, S *et al.* Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. *Blood*, v. 93, n. 6, p. 2013–24, 1999.

COSTENBADER, K H *et al.* Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Arthritis and rheumatism*, v. 50, n. 3, p. 849–57, 2004.

CRISPÍN, J C *et al.* Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 181, n. 12, p. 8761–6, 2008.

DEVLIN, A B; COSTENBADER, K; RAMSEY-GOLDMAN, R. Systemic lupus erythematosus. In: Ramsey-Goldman R, Manzi S. *Women and health*. London: Academic Press, v. 704, 2000.

DONG, F *et al.* The association of PTPN22 rs2476601 polymorphism and CTLA-4 rs231775 polymorphism with LADA risks: a systematic review and meta-analysis. *Acta diabetologica*, 2014.

DORIA, A *et al.* Autoinflammation and autoimmunity: bridging the divide. *Autoimmunity reviews*, v. 12, n. 1, p. 22–30, 2012.

ELIOPOULOS, E. Association of the PTPN22 R620W polymorphism with increased risk for SLE in the genetically homogeneous population of Crete. *Lupus*, v. 20, n. 5, p. 501-6, 2011.

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

FIORILLO, E *et al.* Autoimmune-associated PTPN22 R620W variation reduces phosphorylation of lymphoid phosphatase on an inhibitory tyrosine residue. *The Journal of biological chemistry*, v. 285, n. 34, p. 26506–18, 2010.

FONSECA, A M *et al.* Polymorphisms in STK17A gene are associated with systemic lupus erythematosus and its clinical manifestations. *Gene*, v. 527, n. 2, p. 435–9, 2013.

FORMICA, M K *et al.* Smoking , Alcohol Consumption , and Risk of Systemic Lupus Erythematosus in the Black Women ' s Health Study. *The Journal of rheumatology*, v. 30, n. 6, 2003.

FOUSTERI, G *et al.* The protein tyrosine phosphatase PTPN22 controls FOXP3 regulatory T cell induction but is dispensable for Th1 cell polarization. *Clinical and experimental immunology*, p. 1–32, 2014.

GARCIA, M *et al.* Male systemic lupus erythematosus in a Latin-American inception cohort of 1214 patients. *Lupus*, v. 14, n. 12, p. 938–946, 2005.

GERLI, R *et al.* Identification of regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews*, v. 8, n. 5, p. 426–30, 2009.

GHAUSSY, N O *et al.* Cigarette Smoking and Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of rheumatology*, v. 30, n. 6, 2003.

GOMEZ, L M *et al.* PTPN22 C1858T polymorphism in Colombian patients with autoimmune diseases. *Genes and immunity*, v. 6, n. 7, p. 628–31, 2005.

GREGERSEN, P K; BEHRENS, T W. Genetics of autoimmune diseases--disorders of immune homeostasis. *Nature reviews. Genetics*, v. 7, n. 12, p. 917–28, 2006.

GUPTA, S; LOUIS, A G. Tolerance and Autoimmunity in Primary Immunodeficiency Disease: a Comprehensive Review. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 2013.

HADEIBA, H; BUTCHER, E C. Migration and tolerance: Thymus-homing dendritic cells in central tolerance. *European journal of immunology*, p. 1–12, 2013.

HARVEY, P R; GORDON, C. B-cell targeted therapies in systemic lupus erythematosus: successes and challenges. *BioDrugs: clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, v. 27, n. 2, p. 85–95, 2013.

HASEGAWA, K *et al.* PEST domain-enriched tyrosine phosphatase (PEP) regulation of effector/memory T cells. *Science (New York, N.Y.)*, v. 303, n. 5658, p. 685–9, 2004.

HEALTH DECISION STRATEGIES, EpiMax Table Calculator. Disponível em: <<http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm>>. Acesso em: 10/10/14.

HORWITZ, D A. Identity of mysterious CD4 + CD25 – Foxp3 + cells in systemic lupus erythematosus. p. 3–5, 2010.

HUANG, C *et al.* Associations of the PTPN22 and CTLA-4 genetic polymorphisms with Taiwanese ankylosing spondylitis. *Rheumatology international*, v. 34, n. 5, p. 683–91, 2014.

KARLSON, E W *et al.* Effect of Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Proximity to Hazardous Waste Sites on Time to Systemic Lupus Erythematosus Diagnosis. *Arthritis & Rheumatism*, v. 56, n. 1, p. 244-254, 2007.

KAUFMAN, K M *et al.* Evaluation of the genetic association of the PTPN22 R620W polymorphism in familial and sporadic systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, v. 54, n. 8, p. 2533–40, 2006.

KAWASAKI, E *et al.* Systematic Search for Single Nucleotide Polymorphisms in a Lymphoid Tyrosine Phosphatase Gene ( PTPN22 ): Association Between a Promoter Polymorphism and Type 1 Diabetes in Asian Populations. *American Journal of medical genetics*, v. 593, p. 586–593, 2006.

KIYOHARA, C *et al.* Cigarette smoking, alcohol consumption, and risk of systemic lupus erythematosus: a case-control study in a Japanese population. *The Journal of rheumatology*, v. 39, n. 7, p. 1363–70, 2012.

KREMER HOVINGA, I C L *et al.* Tissue chimerism in systemic lupus erythematosus is related to injury. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 66, n. 12, p. 1568–73, 2007.

KUNZ, M. Lupus erythematosus. Part I: epidemiology, genetics and immunology. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, v. 11, n. 8, p. 709–19; quiz 720, 709–720; quiz 721, 2013.

LAHITA, R G. The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus, *Curr. Opin. Rheumatol*, v. 11, p. 352–356, 1999.

LEA, W W; LEE, Y H. The association between the PTPN22 C1858T polymorphism and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis update. *Lupus*, v. 20, n. 1, p. 51–7, 2011.

LEE, Y H *et al.* The PTPN22 C1858T functional polymorphism and autoimmune diseases--a meta-analysis. *Rheumatology (Oxford, England)*, v. 46, n. 1, p. 49–56, 2007.

LETTRE, G; RIOUX, John D. Autoimmune diseases: insights from genome-wide association studies. *Human molecular genetics*, v. 17, n. R2, p. R116–21, 2008.

LU, Q. The critical importance of epigenetics in autoimmunity. *Journal of autoimmunity*, v. 41, p. 1–5, 2013.

MACREZ, R *et al.* Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *The Lancet. Neurology*, v. 10, n. 5, p. 471–80, 2011.

MAJORCZYK, E *et al.* Association of PTPN22 single nucleotide polymorphism with rheumatoid arthritis but not with allergic asthma. *European journal of human genetics*: EJHG, v. 15, n. 10, p. 1043–8, out. 2007.

MAK, A; TAY, S H. Environmental Factors, Toxicants and Systemic Lupus Erythematosus. *International journal of molecular sciences*, v. 15, n. 9, p. 16043–16056, 2014.

MILLER, S A; DYKES, D D; POLESKY, H F. A simple salting out procedure for extracting DNA fro, human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, v. 16, n.3, 1988.

MOEZ, P; SOLIMAN, E. Association of PTPN22 gene polymorphism and systemic lupus erythematosus in a cohort of Egyptian patients: impact on clinical and laboratory results. *Rheumatology international*, v. 32, n. 9, p. 2753–8, 2012.

MOULTON, V R; TSOKOS, G C. Why do women get lupus? *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, v. 144, n. 1, p. 53–6, 2012.

NAMJOU, B *et al.* PTPN22 association in systemic lupus erythematosus (SLE) with respect to individual ancestry and clinical sub-phenotypes. *PLoS one*, v. 8, n. 8, p. e69404, 2013.

ONISHI, Reiko M; GAFFEN, Sarah L. Interleukin- 17 and its target genes : mechanisms of interleukin- 17 function in disease. p. 311–321, 2010.

OROZCO, G *et al.* Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, v. 52, n. 1, p. 219–24, 2005.

OSTANEK, L *et al.* PTPN22 1858C>T gene polymorphism in patients with SLE: association with serological and clinical results. *Molecular biology reports*, v. 41, n. 9, p. 6195–200, 2014.

PANOPALIS, P; CLARKE, A E; YELIN, E. The economic burden of systemic lupus erythematosus. *Best practice & research. Clinical rheumatology*, v. 26, n. 5, p. 695–704, 2012.

PARENTE COSTA, L *et al.* Juvenile onset Systemic Lupus Erythematosus thyroid dysfunction: a subgroup with mild disease? *Journal of autoimmunity*, v. 33, n. 2, p. 121–4, 2009.

PARK, J *et al.* Bone marrow analysis of immune cells and apoptosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, v. 23, n. 10, p. 975–85, 2014.

PARKS, C G; COOPER, G. S. Occupational exposures and risk of systemic lupus erythematosus: a review of the evidence and exposure assessment methods in population-and clinic-based studies. *Lupus*, v. 15, n. 11, p. 728–736, 2006.

PARKS, C G; DE ROOS, A. J. Pesticides, chemical and industrial exposures in relation to systemic lupus erythematosus. *Lupus*, v. 23, n. 6, p. 527–36, 2014.

PILLAI S; MATTOO H; CARIAPPA A. B cells and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 23:721–731, 2011.

POLLARD, K M. Gender differences in autoimmunity associated with exposure to environmental factors. *Journal of autoimmunity*, v. 38, n. 2-3, p. J177–86, 2012.

PONS-ESTEL, G J *et al.* Understanding the epidemiology and progression of Systemic Lupus Erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*, v. 39, n. 4, p. 1–23, 2010.

QI, Q *et al.* Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014.

RAYMOND, M; ROUSSET, F. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 1995. Disponível em: <<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>>. Acesso em: 10/10/14.

RAPHAEL, Itay *et al.* Cytokine T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *CYTOKINE*, 2014.

REDDY, M V P L *et al.* The R620W C/T polymorphism of the gene PTPN22 is associated with SLE independently of the association of PDCD1. *Genes and immunity*, v. 6, n. 8, p. 658–62, 2005.

REKVIK, O P; VAN DER VLAG, J. The pathogenesis and diagnosis of systemic lupus erythematosus: still not resolved. *Seminars in immunopathology*, v. 36, n. 3, p. 301–11, 2014.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, L *et al.* The PTPN22 R263Q polymorphism is a risk factor for rheumatoid arthritis in Caucasian case-control samples. *Arthritis and rheumatism*, v. 63, n. 2, p. 365–72, fev. 2011

SAHEBARI, M *et al.* Association between serum trace element concentrations and the disease activity of systemic lupus erythematosus. *Lupus*, v. 23, n. 8, p. 793–801, 2014.

SALAMA, A *et al.* Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 (PTPN22) +1858 C>T gene polymorphism in Egyptian cases with rheumatoid arthritis. *Cellular immunology*, v. 290, n. 1, p. 62–5, 2014.

SANZ, I. Rationale for B cell targeting in SLE. *Seminars in immunopathology*, v. 36, n. 3, p. 365–75, 2014.

SAWANT, D V; VIGNALI, D A A. Once a Treg, always a Treg? *Immunological reviews*, v. 259, n. 1, p. 173–91, 2014.

SBR, SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. Consenso Brasileiro de Doenças Reumáticas: Consenso de Lúpus Eritematoso Sistêmico. São Paulo: Sociedade Brasileira de Reumatologia, 26p. 2009.

SBR, SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES): Orientação ao Paciente. Comissão de Lúpus, 2014.

SCHLEINIZ, N; VÉLY, F; HARLÉ, J R; VIVIER E. Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology*, v. 131, n. 4, p. 451-8, 2010.

SCHWARTZMAN-MORRIS, J; PUTTERMAN, C. Gender differences in the pathogenesis and outcome of lupus and of lupus nephritis. *Clinical & developmental immunology*, v. 2012, p. 604892, 2012.

SCOFIELD, R Hal *et al.* Klinefelter's syndrome, 47, YYY, in male Systemic Lupus Erythematosus supports a gene dose effect from the X chromosome. *Arthritis Reum*, v. 58, n. 8, p. 2511–2517, 2010.

SILVA, J A *et al.* Systemic Lupus Erythematosus: Old and New Susceptibility Genes versus Clinical Manifestations. *Current Genomics*, p. 52–65, 2014.

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

SMITH, P P; GORDON, C. Systemic lupus erythematosus: clinical presentations. *Autoimmunity reviews*, v. 10, n. 1, p. 43–5, 2010.

STANFORD, S M; BOTTINI, N. *PTPN22*: the archetypal non-HLA autoimmunity gene. *Nature reviews. Rheumatology*, 2014.

STANGROOM, J. Social Science Statistics. Disponível em: <<http://www.socscistatistics.com/tests/chisquare/>>. Acesso em: 11/11/14

STRITESKY, G L; JAMESON, S C; HOGQUIST, K A. *Annu Rev Immunol*, n. 7, p. 95–114, 2012.

TAKVORIAN, S U; MEROLA, J F; COSTENBADER, K H. Cigarette smoking, alcohol consumption and risk of systemic lupus erythematosus. *Lupus*, v. 23, n. 6, p. 537–44, 2014.

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

TOWER, C *et al.* Regulatory T cells in Systemic Lupus Erythematosus and Pregnancy. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, v. 69, n. 6, p. 588–95, 2013.

TSOKOS, G C; GORDON, C; SMOLEN, J S. Systemic Lupus Erythematosus: A Companion to Rheumatology. Editora Mosby Elsevier, 2007.

TSOKOS, G C. Mechanisms of Disease: Systemic Lupus Erythematosus. *The New England Journal of Medicine*, v.365, p. 2110-2021, 2011.

TURNER, M S; KANE, L P; MOREL, P A. *J Immunol*, v. 183, n. 8, p. 4895–4903, 2011.

VAN BAVEL, C C *et al.* Lupus-derived monoclonal autoantibodies against apoptotic chromatin recognize acetylated conformational epitopes. *Molecular immunology*, v. 48, n. 1-3, p. 248–56, 2010.

VANG, T *et al.* Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nature genetics*, v. 37, n. 12, p. 1317–9, 2005.

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

WAGENLEITER, S *et al.* A case–control study of tyrosine phosphatase (PTPN22) confirms the lack of association with Crohn’s disease. *International Journal of Immunogenetics*, v. 32, p. 323–324, 2005.

WALLING, H W; SONTHEIMER, R D. Cutaneous lupus erythematosus: issues in diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol*, v. 10, p. 365–381, 2009.

WANDSTRAT, A E. *et al.* Autoantibody profiling to identify individuals at risk for systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun*, v. 27, p. 153–160, 2006.

WANG, S *et al.* Identification of a variant form of tyrosine phosphatase LYP. *BMC molecular biology*, v. 11, n. 1, p. 78, 2010.

WU, H *et al.* Association analysis of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 in systemic lupus erythematosus families: increased T allele frequency in systemic lupus erythematosus patients with autoimmune thyroid disease. *Arthritis and rheumatism*, v. 52, n. 8, p. 2396–402, 2005.

YAN, B *et al.* Dysfunctional CD4<sup>+</sup>,CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon-alpha-producing antigen-presenting cells. *Arthritis and rheumatism*, v. 58, n. 3, p. 801–12, 2008.

ZERVOU, M I *et al.* TRAF1/C5, eNOS, C1q, but not *STAT4* and *PTPN22* gene polymorphisms are associated with genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in Turkey. *Human immunology*, v. 72, n. 12, p. 1210–3, 2011.

ZHAI, J *et al.* *CTLA-4* polymorphisms and systemic lupus erythematosus (SLE): a meta-analysis. *Molecular biology reports*, v. 40, n. 9, p. 5213–23, 2013.

ZHANG, J *et al.* The autoimmune disease-associated *PTPN22* variant promotes calpain-mediated LYP/Pep degradation associated with lymphocyte and dendritic cell hyperresponsiveness. *Nat. Genet.*, v. 43, n. 9, p. 902-907, 2011.

ZHANG, Q *et al.* A functional variant of *PTPN22* confers risk for Vogt-Koyanagi-Harada syndrome but not for ankylosing spondylitis. *PLoS one*, v. 9, n. 5, p. e96943, 2014.

ZHEBRUN, D *et al.* Association of *PTPN22* 1858T / T genotype with type 1 diabetes , Graves ' disease but not with rheumatoid arthritis in Russian population. v. 3, n. 4, p. 368–373, 2011.

ZHOU, Y *et al.* T cell CD40LG gene expression and the production of IgG by autologous B cells in systemic lupus erythematosus. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, v. 132, n. 3, p. 362–70, 2009.

ZIEMER, M; MILKOVA, L; KUNZ, M. Lupus erythematosus. Part II: clinical picture, diagnosis and treatment. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, v. 12, n. 4, p. 285–301; quiz 302, 2014.

ZIKHERMAN, J *et al.* *PTPN22* deficiency cooperates with the CD45 E613R allele to break tolerance on a non-autoimmune background. *J. Immunol.*, v. 182, n. 7, p.4093-4106, 2009.

**ANEXOS**

ANEXO A – Termo De Consentimento Livre E Esclarecido pacientes



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM APOIO DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ECLARECIDO**

Informações aos participantes,

Este estudo tem como objetivo investigar aspectos da saúde e genéticos de pacientes que desenvolveram lúpus eritematoso sistêmico e controles saudáveis. Para isto pedimos a colaboração para doar 10 ml de sangue periférico (com anticoagulante EDTA) e para responder um questionário que dura aproximadamente quinze minutos. O questionário e a coleta de material serão feitas por pessoas que fazem parte desta pesquisa e que são devidamente treinados para este fim.

Deixamos claro que a participação dos pacientes nesta pesquisa é voluntária e as informações aqui coletadas, bem como dos resultados das análises genéticas serão mantidos sob sigilo e serão utilizados somente pela equipe interna que faz parte desta pesquisa. Caso o paciente não queira mais participar da pesquisa, poderá reaver sua amostra de DNA.

Toda a equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Caso não queira mais fazer parte da pesquisa, pode entrar em contato pelo telefone (48) 3721-9804.

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO**

Eu declaro que concordo em participar da pesquisa “**Genética da Auto-imunidade**” na condição de voluntário de acordo com os critérios expostos no termo de consentimento livre e esclarecido:

Florianópolis, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

## ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido indivíduos controles.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA  
LABORATÓRIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projetos de Pesquisa:

**“Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina”**

e

**“Genética da autoimunidade: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide em pacientes de Santa Catarina...”**

#### **Informações:**

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo projetos de pesquisa para avaliação de fatores genéticos, doenças e hábitos alimentares e pessoais que podem estar associados ao **aparecimento do câncer de mama e doenças autoimunes**. Para isto pedimos sua **colaboração e permissão** para fazer parte do **grupo controle** e para extrairmos de parte de seu material biológico, uma quantidade pequena de **DNA** (molécula que contém os genes, que são as informações de suas características biológicas). O DNA será analisado no laboratório para tentarmos descobrir se há relação entre alguns genes, propostos nos atuais projetos (ligados ao metabolismo de hormônios sexuais, de substâncias estranhas ao organismo, relacionados ao reparo de DNA e sistema imune) e o aparecimento destas doenças. A amostra coletada nesta ocasião poderá ser utilizada em possíveis futuros projetos que envolvam testes genéticos, aprovados pelo sistema CEP/CONEP, desde que receba novamente sua autorização, após um novo contato. Deixamos claro que **sua participação é voluntária**. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à sua disposição para responder qualquer pergunta que você queira fazer, e esclarecer quaisquer dúvidas que porventura apareçam. Para isso você pode telefonar para o número **(48) 3721-9804** e conversar com a Profª. Dra. Ilíada Rainha de Souza ou seus orientandos.

#### **Procedimentos:**

Caso você concorde em participar, você irá preencher um questionário para sabermos seus dados pessoais (como nome, endereço e telefone) e irá assinar um termo de consentimento livre e esclarecido para que possamos utilizar seus dados pessoais e material biológico nestas pesquisas.

Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa.

O DNA extraído das amostras coletadas será guardado no Laboratório sob responsabilidade da coordenadora do projeto.

Entraremos em contato pelo telefone fornecido o mais breve possível para realizarmos um novo questionário de duração máxima de 20 minutos. Este questionário irá conter dados como seus hábitos alimentares e pessoais, histórico reprodutivo e histórico clínico, essenciais para o desenvolvimento das pesquisas.

**Riscos:**

A coleta de sangue é um procedimento normal para a realização de vários exames. O aparecimento de mancha roxa ou dor no local da espetada da agulha podem ocorrer sem representar maiores preocupações. As informações coletadas, bem como os resultados das análises genéticas serão mantidas em sigilo e serão utilizadas somente pela equipe da pesquisa.

**Custos:**

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

**Benefícios**

Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão no futuro proporcionar novas alternativas para prevenção do câncer de mama e doenças autoimunes, e para identificação de pessoas que tem risco de desenvolver essas doenças, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

**Assinaturas:**

**Pesquisador responsável** \_\_\_\_\_

Florianópolis, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

---

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO**

**Eu, \_\_\_\_\_, fui esclarecido(a) sobre as pesquisas “Câncer de mama: avaliação de parâmetros informativos para diagnóstico e prognóstico na população do estado de Santa Catarina” e “Genética da autoimunidade: polimorfismos em lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide em pacientes de Santa Catarina”, e concordo que meus dados sejam utilizados na realização das mesmas.**

Florianópolis,

Assinatura: \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_

## ANEXO C – Questionário pacientes



Universidade Federal de Santa Catarina  
 Departamento de Biologia Molecular, Embriologia e Genética/CCB  
 Departamento de Clínica Médica/CCS  
 Análise de Polimorfismos Gênicos em Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico

NOME: \_\_\_\_\_ PRONTUÁRIO/HU: \_\_\_\_\_

IDADE: \_\_\_\_ anos SEXO: ( )F ( )M COR da Pele: \_\_\_\_\_

Procedência: \_\_\_\_\_ Natural de: \_\_\_\_\_

Estado Civil: ( )S ( )C ( )D ( )V Ocupação: \_\_\_\_\_

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

DATA: \_\_/\_\_/\_\_\_\_ LUP: \_\_\_\_\_

Médico: \_\_\_\_\_

Entrevistador: \_\_\_\_\_

**DADOS Familiares:**

NOME do pai: \_\_\_\_\_

CIDADE onde nasceu: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

DESCENDÊNCIA: Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

NOME da mãe: \_\_\_\_\_

CIDADE onde nasceu: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

DESCENDÊNCIA: Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

TEMPO de doença diagnosticada: \_\_\_\_\_

HISTÓRIA FAMILIAR: Lúpus: ( )S ( )N Parentesco: \_\_\_\_\_

Outras D. Reumat.: ( )S ( )N Parentesco: \_\_\_\_\_

MANIFESTAÇÕES INICIAIS: ( ) Febre ( ) Alopecia  
 ( ) Fenômeno de Raynaud ( ) Rash Malar  
 ( ) Rash Discóide ( ) Fadiga  
 ( ) Artrite ( ) Fotossensibilidade  
 ( ) Úlcera oral ou nasal ( ) Serosite  
 ( ) Distúrbio Renal ( ) Distúrbio Neurológico  
 ( ) Distúrbio Hematológico ( ) Hipertensão Arterial  
 ( ) Vasculite ( ) Outras. Quais? \_\_\_\_\_

**Evolução: INTERNAções:** ( )S ( )N Quantas? \_\_\_\_\_ Motivos? \_\_\_\_\_

---



---

**MANIFestações ASSOCIadas:** ( )S ( )N Quais? \_\_\_\_\_

---



---

**SOBREPosição com alguma  
outra doença reumatológica:**

- ( ) Esclerodermia
- ( ) Sjögren
- ( ) Dermatomiosite
- ( ) Síndrome do anticorpo fosfolípido (SAF)
- ( ) Fibromialgia
- ( ) Outras Quais? \_\_\_\_\_

**OBServações:** diabetes? Depressão?

---



---



---

**SINTomatologia RECente:** ( ) Febre ( ) Alopecia  
 (últimos 10 dias) ( ) Fenômeno de Raynaud ( ) Rash Malar  
 ( ) Rash Discóide ( ) Fadiga  
 ( ) Artrite ( ) Fotossensibilidade  
 ( ) Úlcera oral ou nasal ( ) Serosite  
 ( ) Distúrbio Renal ( ) Distúrbio Neurológico  
 ( ) Distúrbio Hematológico ( ) Hipertensão Arterial  
 ( ) Vasculite ( ) Outras. Quais? \_\_\_\_\_

.....  
**Tratamento Atual:**

**CORTICosteróides:** ( )S ( )N Qual? \_\_\_\_\_

Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**AZATioprina:** ( )S ( )N Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**ANTIMALárico:** ( )S ( )N Qual? \_\_\_\_\_

Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**METOTrexato:** ( )S ( )N Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**CICLOSPorina:** ( )S ( )N Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**CICLOFosfamida:** ( )S ( )N Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**AINE:** ( )S ( )N Qual? \_\_\_\_\_

Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**ANALGésicos:** ( )S ( )N Qual? \_\_\_\_\_

Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**Outros:** ( )S ( )N Quais? \_\_\_\_\_

Dose? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

**Idade da MENARCA:** \_\_\_\_\_ anos **MENOPAUSA:** ( )S ( )N Idade: \_\_\_\_\_ anos

**GESTA:** \_\_\_\_\_ **PARA:** \_\_\_\_\_ **FASE do Ciclo Reprodutivo:** ( )Menacme  
( )Climatério

**Tratamento HORMONAL Antes do Diagnóstico:** ( )S ( )N Qual? ( )AC ( )Outro

Duração: \_\_\_\_\_ Parou há quanto tempo? \_\_\_\_\_

**Tratamento MEDICAMENTOSO Antes do Diagnóstico:** ( )S ( )N

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

**História de Uso de DROGAS:** Álcool: ( )S ( )N Tipo? \_\_\_\_\_

Qtde? \_\_\_\_\_ Freqüência? \_\_\_\_\_

Cigarro: ( )S ( )N Cigarros/dia: \_\_\_\_\_

Se fumava, qual a duração? \_\_\_\_\_

Quando parou? \_\_\_\_\_

Algum familiar ou amigo próximo é fumante?  
\_\_\_\_\_

Drogas Ilícitas: ( )S ( )N Qual? \_\_\_\_\_

Por quanto tempo? \_\_\_\_\_

**SLEDAI**  
**(Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index)**  
**Modificação SELENA**

Avaliação Global do Médico \_\_\_\_\_

0    1    2    3  
Nula   Leve   Média   Severa

**\* Favor marcar “X” para presença, “0” (zero) para ausência**  
**Score SLEDAI**

Marque se o descriptor estiver presente no momento da visita ou nos 10 dias anteriores.

<b>Pes</b>	<b>Pres.</b>	<b>Descriptor</b>	<b>Definição</b>
8	( )	Convulsão	Início recente. Excluir causa metabólica, infecciosa ou farmacológica.
8	( )	Psicose	Alterações na habilidade de exercer atividades normais devido a distúrbio severo na percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico, conteúdo pobre de pensamentos. Excluir uremia e causas farmacológicas.
8	( )	Síndrome Cerebral Orgânica	Função mental alterada com diminuição da orientação, memória ou outras funções inteligentes, com início abrupto e características clínicas flutuantes. Inclui redução da consciência com capacidade reduzida de concentração e incapacidade de manter-se atento ao ambiente, mais pelo menos 2 dos seguintes: distúrbio de percepção, fala incoerente, insônia ou sonolência diurna, ou atividade psicomotora aumentada ou

			diminuída. Excluir causas metabólicas, infecciosas ou farmacológicas.
8	( )	Distúrbio Visual	Alterações retinianas do lupus.. Inclui corpos citóides, hemorragias retinianas, hemorragia ou exsudato na coróide ou neurite óptica. Excluir hipertensão, infecção ou causas farmacológicas.
8	( )	Distúrbio em Nervo Craniano	Início recente de neuropatia sensorial ou motora envolvendo nervos cranianos.
8	( )	Cefaléia do Lupus	Cefaléia severa e persistente: pode ser migranosa, mas deve ser não-responsiva a analgesia narcótica.
8	( )	AVC	Início recente de AVC. Excluir aterosclerose
8	( )	Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos moles nos dedos, infarto periungueal, hemorragia em cunha, ou biópsia ou angiograma provando vasculite.
4	( )	Artrite	Mais do que 2 articulações com dor e sinais de inflamação (i.e. edema, derrame articular ou sensibilidade)
4	( )	Miosite	Fraqueza ou dor muscular proximais, associada com CPK/aldolas elevada ou mudanças no eletromiograma ou biópsia mostrando miosite.
4	( )	Cilindros Urinários	Cilindros de hemácias ou heme-granulares.
4	( )	Hematúria	>5 hemácias/campo. Excluir cálculo, infecção ou outra causa.
4	( )	Proteinúria	>0,5 g/24 h. Início recente ou aumento recente de mais que 0,5 g/24 h.
4	( )	Piúria	>5 leucócitos/campo. Excluir infecção.
2	( )	<i>Rash</i> Novo	Início recente ou recorrência de

			<i>rash</i> do tipo inflamatório.
2	( )	Alopécia	Início recente ou recorrência de perda de cabelo anormal, em placas ou difusa.
2	( )	Úlceras em Mucosas	Início recente ou recorrência de ulcerações nasais ou orais.
2	( )	Pleurisia	Dor torácica pleurítica com atrito pleural ou derrame, ou espessamento pleural.
2	( )	Pericardite	Dor de origem pericárdica ou pelo menos 1 dos seguintes: atrito, derrame ou confirmação eletrocardiográfica.
2	( )	Complemento Baixo	Diminuição no CH50, C3 ou C4 abaixo do limite inferior do laboratório.
2	( )	Agregação de DNA Aumentada	>25% por ensaio Farr or acima da variação normal para o laboratório
1	( )	Febre	>38°C. Excluir causas infecciosas.
1	( )	Trombocitopenia	<100.000 plaquetas/mm <sup>3</sup> .
1	( )	Leucopenia	<3000 leucócitos/mm <sup>3</sup> . Excluir causas farmacológicas

\_\_\_\_\_ Score Total (soma dos pesos)

<b>Crise Leve ou Moderada ( )</b>	<b>Severa ( )</b>
( ) Mudança no SLEDAI >3 pontos	( ) Mudança no SLEDAI >12 pontos
( ) Úlceras nasofaríngeas Pleurite Pericardite Artrite Febre (LES) Lupus bolhoso, vasculite cutânea, profunda, fotossensível e discóide recente/pior	( ) SNC-LES recente ou pior Vasculite (????) Nefrite Miosite Pk<60.000 Hb<7% ou diminuição na HB>3% Precisando de prednisona em dobro
( ) Aumento na prednisona, mas não para mais que 0,5 mg/kg/dia	( ) Prednisona>0,5 mg/kg/dia

<input type="checkbox"/> Adicionado AINE ou Plaquenil	<input type="checkbox"/> Necessidade de Azatioprina, Metotrexato ou Hospitalização pelo LES
<input type="checkbox"/> Aumento na PGA maior ou igual a 1 mas não maior que 2,5	<input type="checkbox"/> Aumento no PGA para mais de 2,5

## ANEXO D – Questionário controles



Universidade Federal de Santa Catarina  
 Centro de Ciências Biológicas  
 Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética – BEG  
 Laboratório de Polimorfismos Genéticos

**QUESTIONÁRIO – GRUPO CONTROLE**

## IDENTIFICAÇÃO

Data: \_\_/\_\_/\_\_ Coleta: ( ) sangue

**Dados Pessoais:**

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Telefone Residencial: \_\_\_\_\_

Telefone Trabalho: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: ( ) M ( ) F Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Estado Civil: \_\_\_\_\_ Tipo de sangue: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ Aposentado: ( ) Sim ( ) Não

Escolaridade: ( ) analfabeto ( ) 1º grau incompleto

( ) 1º grau completo ( ) 2º grau incompleto

( ) 2º grau completo ( ) superior incompleto

( ) superior completo ( ) pós graduação

Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_

Ascendência: Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Etnia: ( ) Euro descendente ( ) Afro descendente

( ) Asiático descendente ( ) Indígena descendente

Cor da pele: ( ) negra ( ) mulata ( ) amarela ( ) branca

Observação: \_\_\_\_\_

**Dados Familiares:**

Nome do pai: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_

Ascendência do pai:

Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Cidade onde nasceu: \_\_\_\_\_

Descendência da mãe:

Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_

Possui Irmãos: ( ) Sim ( ) Não Quantos: \_\_\_\_\_

Possui filhos: ( ) Sim ( ) Não Quantos: \_\_\_\_\_

Ingere **BEBIDA ALCOÓLICA**? ( ) Sim ( ) Não

Frequência: ( ) Todos os dias ( ) Fim de semana ( ) Esporadicamente (Festas)

Quantidade (copos 200ml): \_\_\_\_\_

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

( ) Cerveja ( ) Vinho ( ) Cachaça ( ) Outro \_\_\_\_\_

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

( ) Cerveja ( ) Vinho ( ) Cachaça ( ) Outro \_\_\_\_\_

Pratica **EXERCÍCIOS FÍSICOS**? ( ) Sim ( ) Não

Tipo: \_\_\_\_\_

Quantidade: ( ) menos de 30 min ( ) 30 min ( ) 1h ( ) mais de 1 h

Frequência: ( ) 1x semana ( ) 2-3x semana ( ) 4-6x semana

( ) Todos os dias ( ) Menos de 1x semana

Você **FUMA**? ( ) Sim ( ) Não Você já **FUMOU**? ( ) Sim ( ) Não

Tipo: ( ) Cigarro ( ) Charuto ( ) Cachimbo ( ) Outro \_\_\_\_\_

Quantidade e Frequência (nº de cigarros por dia): \_\_\_\_\_

Tempo que fuma ou fumou: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo parou: \_\_\_\_\_

### **Histórico Hormonal e Reprodutivo**

Idade da MENARCA: \_\_\_\_\_

MENOPAUSA: ( ) Sim ( ) Não Idade: \_\_\_\_\_

HISTERECTOMIA: ( ) Sim ( ) Não

PARIDADE:

Nº de gestações \_\_\_\_\_ Idade da 1ª estação \_\_\_\_\_

Nº de filhos ( ) nulípara N: \_\_\_\_\_

Abortos ( ) P ( ) E N: \_\_\_\_\_

Amamentou: ( ) Sim ( ) Não Tempo total (meses): \_\_\_\_\_

#### TRAT. HORMONAL:

Utiliza AC? ( ) Sim ( ) Não Já utilizou AC? ( ) Sim ( ) Não

Nome e tipo (oral, adesivo, injetável) do AC: \_\_\_\_\_

Tempo que usa ou usou AC: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo parou? \_\_\_\_\_

Faz TRH? ( ) Sim ( ) Não Já fez TRH? ( ) Sim ( ) Não

Nome do Hormônio: \_\_\_\_\_

Tempo que faz ou fez TRH: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo parou? \_\_\_\_\_

( ) Outros hormônios \_\_\_\_\_ Tempo total: \_\_\_\_\_

Obeserações: \_\_\_\_\_

---

#### Histórico Médico

Caso de **CÂNCER** pessoal? ( ) Sim ( ) Não

Tipo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Casos de **CÂNCER DE MAMA** na família? ( ) Sim ( ) Não

Grau de Parentesco: ( ) filha ( ) irmã ( ) mãe ( ) avó

( ) tia materna 1º grau ( ) tia paterna 1º grau

( ) prima materna 1º grau ( ) prima paterna 1º grau

( ) Outros \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Casos de **CÂNCER** de outro tipo na família? ( ) Sim ( ) Não

Grau de Parentesco e tipo: \_\_\_\_\_

---

---

Caso de **TUMOR BENIGNO** pessoal? ( )Sim ( ) Não

Local: \_\_\_\_\_

---

Caso de **DOENÇA AUTOIMUNE** pessoal? ( )Sim ( ) Não

Qual? \_\_\_\_\_

---

Tempo de diagnóstico: \_\_\_\_\_

Casos de **DOENÇA AUTOIMUNE** na família? ( )Sim ( ) Não

Grau de Parentesco e tipo: \_\_\_\_\_

---

---

Você tem alguma **DOENÇA CARDIOVASCULAR**? ( )Sim ( ) Não

Qual? (s) \_\_\_\_\_

---

---

HIPERTENSÃO ARTERIAL: ( )Sim ( ) Não

HIPERCOLESTEROLEMIA: ( )Sim ( ) Não

OSTEOPOROSE: ( )Sim ( ) Não

DOENÇA REUMÁTICA: ( )Sim ( ) Não

DIABETES: ( )Sim ( ) Não

ASMA: ( )Sim ( ) Não

HIV: ( )Sim ( ) Não ( ) Nunca fez exame

HEPATITE: ( )Sim ( ) Não ( ) Nunca fez exame

DENGUE: ( )Sim ( ) Não

TUBERCULOSE: ( )Sim ( ) Não

DISTÚRPIO RENAL: ( )Sim ( ) Não

DISTÚRPIO PULMONAR: ( )Sim ( ) Não

DISTÚRPIO HEPÁTICO: ( )Sim ( ) Não

Casos de **DOENÇA DE ALZHEIMER** na família: ( )Sim ( ) Não

Grau de parentesco: \_\_\_\_\_

Casos de DOENÇA DE PARKINSON na família: ( ) Sim ( ) Não

Grau de parentesco: \_\_\_\_\_

OUTRAS DOENÇAS?: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Alérgico a algum medicamento? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Alérgico a algum alimento? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Teve DEPRESSÃO? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Utilizou ou utiliza alguma medicação por longo tempo? ( ) Sim ( ) Não

Nome do medicamento (dosagem e frequência) e tempo que utilizou:

\_\_\_\_\_