



**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE HUMANA**

ANNA PAULA MOTA DUQUE SOUSA

**PERFIL DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PACIENTES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO COM OU SEM ARTROPATIA DE JACCOUD**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SALVADOR

2018

ANNA PAULA MOTA DUQUE SOUSA

**PERFIL DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PACIENTES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO COM OU SEM ARTROPATIA DE JACCOUD**

Dissertação apresentada ao curso de
Pós-Graduação em Medicina e Saúde
Humana da Escola Bahiana de Medicina
e Saúde Pública como requisito parcial
para título de Mestre em Medicina e
Saúde Humana

Orientador: Prof. Dr. Mittermayer Barreto
Santiago

SALVADOR

2018

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas

S725 Sousa, Anna Paula Mota Duque
Perfil de polimorfismo genético em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico com
ou sem artropatia de Jaccoud. / Anna Paula Mota Duque Sousa. – 2018.
87f.: il. Color; 30cm.

Orientador: Prof. Dr. Mittermayer Barreto Santiago

Mestre em Medicina e Saúde Humana

Inclui bibliografia

1. Artropatia de Jaccoud. 2. Polimorfismo. 3. Lúpus Eritematoso Sistêmico.
I. Título.

CDU: 616.5

ANNA PAULA MOTA DUQUE SOUSA

"PERFIL DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS EM PACIENTES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO COM OU SEM ARTROPATIA DE JACCOUD"

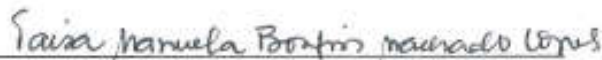
Dissertação apresentada à Escola
Bahiana de Medicina e Saúde
Pública, como requisito parcial para
a obtenção do Título de Mestre em
Medicina e Saúde Humana.

Salvador, 30 de julho de 2018.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Isabella Vargas de Souza Lima
Doutora em Medicina e Saúde Humana
Universidade Federal da Bahia, UFBA



Profa. Dra. Taísa Manuela Bonfim Machado Lopes
Doutora em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
Universidade Federal da Bahia, UFBA



Profa. Dra. Luana Leandro Gois
Doutora em Biotecnologia aplicada a saúde e medicina investig
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP

Dedico esta dissertação aos meus familiares, em especial meu esposo, André Luis Sousa, e minha irmã, Anna Clara Duque, que tanto me encorajaram na realização e conclusão deste projeto, mesmo em meio a todas as dificuldades. Também à minha mãe (Dirlene Mota), avó (Dinalva Mota) e dinda (Gilma Mota), que me apoiaram com suas orações e amor cotidianos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus colegas e professores da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, cuja convivência ao longo desses anos me proporcionou grande aprendizado científico e pessoal. A dra. Giselle Calasans e dra. Maria Fernanda Grassi, que me ajudaram na execução deste trabalho e superação dos desafios diários. A dr. Gustavo Costa e dr. Lúcio Barbosa, por suas relevantes contribuições e parcerias. Ao meu orientador, dr. Mittermayer Santiago, pelo exemplo de humanidade e profissionalismo.

“A persistência é o menor caminho do
êxito.”

(Charles Chaplin)

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Bahia

Universidade Federal da Bahia (UFBA)

FINANCIAMENTO

Bolsa do orientador de produtividade em pesquisa (recursos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq)

RESUMO

Introdução: Genes como o Antígeno Leucocitário Humano (*HLA*), o Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 4 (*STAT4*), o Fator 5 Regulador de Interferon (*IRF5*) e Quinase Linfóide B (*BLK*) podem contribuir para induzir autoimunidade através da ativação de células B e T e aumento da produção de Interferon. Eles foram associados a Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) após estudos do genoma humano inteiro (GWAS), em populações europeias, asiáticas e ameríndias não-brasileiras. Os objetivos deste estudo são: avaliar se há associação desses genes com a presença de LES, em pacientes brasileiros, portadores ou não de Artropatia de Jaccoud (AJ), e verificar sua possível relação com o tipo de apresentação clínica e laboratorial de LES. **Métodos:** 144 pacientes com diagnóstico de LES, cadastrados em dois serviços de Reumatologia - Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) e Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES)/Universidade Federal da Bahia (UFBA), Brasil - foram incluídos neste estudo. Destes pacientes com LES, selecionamos 38 portadores de AJ. Um grupo de 614 indivíduos sem LES foi utilizado como controle negativo. As características clínicas e laboratoriais dos pacientes com LES, com ou sem AJ, foram avaliadas. Todos os participantes foram genotipados para os polimorfismos rs9271100, rs7574865, rs10488631 e rs13277113 nos genes *HLA*, *STAT4*, *IRF5* e *BLK*, respectivamente, pela técnica de PCR em tempo real. Para o cálculo das frequências genotípicas, utilizou-se os modelos de herança aditivo e alélico. As frequências alélicas e genotípicas foram correlacionadas com a presença de LES, suas manifestações clínico-laboratoriais e AJ, com ajuste para sexo, cor da pele e/ou idade, em análise multivariada. **Resultados:** O alelo T e os genótipos TT e GT do polimorfismo rs7574865, no gene *STAT4*, e o alelo C e os genótipos CC e CT do polimorfismo rs10488631, no *IRF5*, apresentaram maiores frequências na população com LES. Na análise multivariada, apenas o polimorfismo rs7574865, no gene *STAT4*, apresentou associação com LES. Não houve associação entre os polimorfismos avaliados e as manifestações do LES. Os pacientes com AJ mostraram maior tempo de doença (relacionado ao diagnóstico do LES), maior prevalência de serosite e transtornos psiquiátricos quando comparados aos pacientes com LES sem AJ. O alelo A e os genótipos AA e AG do polimorfismo rs13277113, no *BLK*, apresentaram associação com a presença de AJ, na população com LES. **Conclusões:** Este trabalho é pioneiro na avaliação de polimorfismos genéticos, em pacientes brasileiros, com LES, que desenvolveram AJ. Foi observada uma associação dos SNPs rs7574865 e rs10488631, nos genes *STAT4* e *IRF5*, respectivamente, com o desenvolvimento de LES, conforme estabelecido previamente em outras populações. Não houve associações significativas entre esses polimorfismos e as manifestações do LES, porém a AJ apresentou um possível risco genético, relacionado ao polimorfismo rs13277113, no gene *BLK*.

Palavras-chave: Lúpus Eritematoso Sistêmico. Artropatia de Jaccoud. Polimorfismos.

ABSTRACT

Introduction: Genes like Human Leukocyte Antigen (*HLA*), Signal Transducer and Activator of Transcription 4 (*STAT4*), Interferon Regulatory Factor 5 (*IRF5*) and B Lymphoid Kinase (*BLK*) contribute to induce autoimmunity by increasing B and T cells activation and Interferon production. These molecules were associated with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) after Genome-Wide Association Scans (GWAS) in European, Asian and non-Brazilian Amerindian populations. The goals of this study are to evaluate if there is association of these genes with the presence of SLE, in Brazilian patients, and to verify if there is some relationship with Jaccoud Arthropathy (JA) or type of clinical and laboratory presentation of SLE. **Methods:** 144 patients diagnosed with SLE, enrolled in two services of Rheumatology, in Brazil - Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) and Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES)/Universidade Federal da Bahia (UFBA) – were included in this study. Of these SLE patients, we selected 38 JA carriers. A group of 614 individuals without SLE was used as a negative control. LES and JA patients were evaluated for their clinical and laboratory characteristics. All participants were genotyped for rs9271100, rs7574865, rs10488631 and rs13277113 polymorphisms in the *HLA*, *STAT4*, *IRF5* and *BLK* genes, respectively, by real-time PCR technique. For the calculation of genotypic frequencies, it was used the additive and allelic heritability models. Their allelic and genotypic frequencies were correlated with the presence of SLE, JA and/or SLE manifestations, adjusted for sex, skin color and/or age, in multivariate analysis. **Results:** The T allele, TT and GT genotypes of rs7574865 in *STAT4* and C allele, CC and CT genotypes of rs10488631 in *IRF5* presented higher frequencies in the SLE population. In multivariate analysis, only the analysed SNP at *STAT4* gene was associated with SLE. There were no associations between the polymorphisms evaluated and SLE manifestations. JA patients had a longer SLE disease, higher prevalence of serositis and psychiatric disorders when compared to patients with SLE without JA. The A allele, AA and AG genotypes of rs13277113 in *BLK* showed a correlation with the presence of JA. **Conclusions:** This paper is a pioneer in the evaluation of genetic polymorphisms in Brazilian SLE patients that developed AJ. It was observed an association among rs7574865 and rs10488631 polymorphisms at *STAT4* and *IRF5* genes, respectively, and SLE development, as established in other populations. There were no important associations between these polymorphisms and the SLE manifestations, but we found a possible genetic risk for JA, the rs13277113 polymorphism at *BLK* gene.

Key-words: Systemic Lupus Erythematosus. Jaccoud Arthropathy. Polymorphisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Critérios classificatórios de Lúpus Eritematoso Sistêmico pelo Colégio Americano de Reumatologia, de 1997.....	18
Figura 02 - Interação dos fatores ambientais e genéticos em LES.....	20
Figura 03 – Genes de susceptibilidade para LES e suas atuações nas vias patogênicas.....	22
Figura 04 – Participação dos IRFs e STATs na regulação de Interferon.....	26
Figura 05 - Artropatia de Jaccoud, forma mutilante.....	29
Figura 06 - Curvas dos fluoróforos (FAM/VIC) específicos para cada alelo: discriminação dos alelos mutante e selvagem.....	34
Figura 07 - Fluxograma dos indivíduos selecionados.....	37
Quadro 01 - Classificação de genes de risco para LES segundo seu papel fisiopatogênico.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Características demográficas dos pacientes portadores de LES e indivíduos sem LES.....	38
Tabela 02 - Frequência alélica de polimorfismos nos genes <i>STAT4</i> , <i>HLA</i> , <i>IRF5</i> e <i>BLK</i> e análise multivariada ajustada por sexo, nos pacientes portadores de LES.....	39
Tabela 03 - Frequência genotípica de polimorfismos nos genes <i>STAT4</i> , <i>HLA</i> , <i>IRF5</i> e <i>BLK</i> e análise multivariada ajustada por sexo e cor, nos pacientes portadores de LES.....	40
Tabela 04 – Frequência dos genótipos de menor frequência em polimorfismos nos genes <i>STAT4</i> , <i>HLA</i> , <i>IRF5</i> e <i>BLK</i> segundo as manifestações clínicas e laboratoriais, nos pacientes portadores de LES.....	41
Tabela 05 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico, com ou sem Artropatia de Jaccoud....	42
Tabela 06 - Frequência alélica de polimorfismos nos genes <i>STAT4</i> , <i>HLA</i> , <i>IRF5</i> e <i>BLK</i> e análise multivariada ajustada por sexo e idade, nos pacientes com Artropatia de Jaccoud.....	43
Tabela 07 - Frequência genotípica de polimorfismos nos genes <i>STAT4</i> , <i>HLA</i> , <i>IRF5</i> e <i>BLK</i> e análise multivariada, ajustada por sexo e idade, nos pacientes com Artropatia de Jaccoud.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJ	Artropatia de Jaccoud
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
SBR	Sociedade Brasileira de Reumatologia
ACR	Colégio Americano de Reumatologia
FAN	Fator antinuclear
GWAS	Estudos de associação do genoma inteiro
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeos únicos
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
IRF5	Fator 5 Regulador de Interferon
STAT4	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 4
BLK	Quinase Linfóide B
NF- κ B	Fator Nuclear κ B
ITGAM	Integrina-alfa-M
AR	Artrite Reumatóide
SLICC	Clínicas Internacionais Colaboradoras para o estudo de Lúpus Sistêmico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo primário	16
2.2	Objetivos secundários	16
3	REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1	Lúpus Eritematoso Sistêmico	17
3.2	Fatores de risco genéticos e ambientais	19
3.3	Vias fisiopatogênicas de destaque	21
3.4	Genes e polimorfismos associados a LES	24
3.4.1	<i>HLA</i> (Antígeno Leucocitário Humano)	25
3.4.2	<i>IRF5</i> (Fator 5 Regulador de Interferon)	26
3.4.3	<i>STAT4</i> (Transdutor e Ativador de Sinal de Transcrição 4)	27
3.4.3	<i>BLK</i> (Quinase Linfóide B)	27
3.4.5	Genes associados a subfenótipos do LES	28
3.4	Artropatia de Jaccoud	28
3.5	Justificativa do estudo	30
4	METODOLOGIA	31
4.1	Desenho do estudo	31
4.2	Seleção da população	31
4.2.1	Critérios de inclusão	31
4.2.2	Critérios de exclusão	31
4.3	Coleta de dados clínicos e laboratoriais	32
4.4	Avaliação dos polimorfismos	32
5	ESTATÍSTICAS	35
5.1	Hipóteses	35
5.2	Váriáveis	35
5.3	Tamanho amostral	35
5.4	Análises estatísticas	36
6	RESULTADOS	37
6.1	Seleção de pacientes	37
6.2	Resultados descritivos e comparativos em pacientes com LES e sem LES	37
6.3	Associação dos polimorfismos de risco e manifestações clínicas e laboratoriais do LES	40
6.4	Resultados descritivos e comparativos em pacientes com LES: com e sem AJ	41
7	DISCUSSÃO	45
8	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS DO ESTUDO	52
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICE	62
	ANEXOS	63

1 INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica, de caráter autoimune e com potencial de afetar múltiplos órgãos e tecidos, segundo definições do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) e Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR). Ele se apresenta e evolui de forma clínica variável ao longo do tempo, com fases de atividade ou remissão. Segundo dados da SBR, as mulheres podem ser acometidas pelo LES até nove vezes mais do que os homens, e os afro-descendentes quatro vezes mais do que os caucasianos. Aproximadamente, 1 a cada 1.700 mulheres no Brasil é portadora da doença. Estima-se um total de 65.000 brasileiros com LES. No âmbito mundial, a incidência de LES é aproximadamente 1 a 10 casos por 100.000 pessoas/ano e a prevalência varia de 20 a 70 por 100.000 habitantes. O LES representa importante causa de morbi-mortalidade no Brasil e no mundo, principalmente em indivíduos jovens, em idade reprodutiva. A taxa de mortalidade por LES no Brasil é de 4 a 5 pessoas por 100.000 habitantes ⁽¹⁾. Da mesma forma que no Brasil, as taxas de mortalidade mundiais são elevadas, principalmente no primeiro ano após o diagnóstico da doença e também dependem da situação socioeconômica do país ⁽²⁾. Além disso, os sintomas e sequelas da doença e de seu tratamento podem levar a um forte impacto físico e psicossocial na vida do paciente e da comunidade.

As causas e a fisiopatogênese do LES não são totalmente compreendidas. Acredita-se que seja uma doença de etiologia multifatorial, na qual fatores de susceptibilidade genéticos e ambientais interagem para resultar no fenótipo da doença ⁽³⁾.

Estudos genéticos de pacientes com LES, em diversas populações, possibilitaram a descoberta de mais de 80 loci de susceptibilidade da doença, porém não se sabe os efeitos e funções de todos esses loci de risco. Postula-se que muitos deles estejam envolvidos com a funcionalidade de células do sistema imune, em situações de fagocitose, eliminação de DNA e *debris* celulares, *clearance* de imunocomplexos, apoptose, sinalização de monócitos, neutrófilos, linfócitos B e T, receptores do tipo Toll, vias moleculares do NFκB e regulação de Interferon. Os estudos genômicos de associação familiares e de larga escala do genoma (do inglês - Genoma-Wide Association Scans, GWAS) em pacientes com LES identificaram a

grande parte dos genes atualmente associado a LES ⁽⁴⁾. A região do Antígeno Leucocitário Humano (*HLA*), principalmente os alelos *HLA DRB1*1501* (HLA-DR2) e *HLA DRB1*0301* (HLA-DR3), é fortemente associada ao desenvolvimento de LES em várias populações da Europa. Fora da região do HLA, mutações em outros genes, como no Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 4 (*STAT4*), o Fator 5 Regulador de Interferon (*IRF5*), Quinase Linfóide B (*BLK*) e Integrina-alfa-M (*ITGAM*), dentre outros, tem se destacado ^(5, 6). Esses polimorfismos genéticos (mutações que apresentam frequência acima de 1% na população) estão implicados no desenvolvimento de LES, o que foi descoberto inicialmente em populações européias e, posteriormente, em asiáticos e ameríndios ^(5, 7-9).

Aproximadamente 5% dos pacientes com LES, apresentam uma artropatia deformante não-erosiva, portanto não-fixa, denominada Artropatia de Jaccoud (AJ), que se manifesta com deformidades, semelhantes àquelas da Artrite Reumatóide (AR) ⁽¹⁰⁾. A AJ pode gerar prejuízos na execução de atividades da vida diária do paciente com LES. Uma forma descrita como AJ severa ou mutilante apresenta deformidades fixas, irreversíveis, levando a um maior comprometimento da função articular ⁽¹¹⁾. Em relação à AJ, não há estudos de impacto que abordem uma possível susceptibilidade genética para o desenvolvimento dessa artropatia. Apenas um estudo com 9 pacientes com AJ (dentre 340 pacientes com LES), procedentes do Japão, encontrou a presença de *HLA* classe I (A 11 e B 61) em 55% dos pacientes com AJ ⁽¹²⁾. Não há outros estudos abordando este tema.

Dessa forma, há evidências na literatura que respaldam a susceptibilidade genética para a manifestação do LES e a atuação dos polimorfismos genéticos na regulação ou expressão de moléculas importantes para a quebra de tolerância do sistema imune, em diferentes vias patogênicas do LES. Existe uma escassez de estudos genéticos em pacientes brasileiros com LES e nos pacientes portadores de AJ. O objetivo deste trabalho é avaliar a existência de associação entre polimorfismos genéticos e o desenvolvimento de LES, associado ou não a AJ, numa população da Bahia, Brasil. Para tal, avaliaremos quatro polimorfismos – rs9271100 no gene *HLA*, rs10488631 no gene *IRF5*, rs7574865 no gene *STAT4* e rs13277113 no gene *BLK* – os quais já demonstraram previamente associação significativa com LES, em populações européias, asiáticas e ameríndias não-brasileiras. Nossa hipótese é que esses polimorfismos são mais prevalentes na população com LES e/ou AJ quando comparado aos indivíduos sem essas patologias. O impacto de

estudos genéticos na prática clínica se dá na medida em que possibilita uma maior compreensão da fisiopatogenia e viabiliza atuações diagnósticas, terapêuticas e/ou preventivas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo primário

Avaliar se os polimorfismos - rs9271100 no gene *HLA*, rs10488631 no gene *IRF5*, rs7574865 no gene *STAT4* e rs13277113 no gene *BLK* – estão associados com o desenvolvimento de LES e/ou AJ.

2.2 Objetivos secundários

- Verificar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos analisados na população com LES, associado ou não a AJ, e indivíduos sem LES;
- Caracterizar o perfil clínico e laboratorial dos pacientes com AJ e LES;
- Avaliar se os polimorfismos analisados podem influenciar o perfil de manifestações clínicas e laboratoriais dos pacientes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico

O LES é descrito desde a época medieval. A palavra lúpus, de origem latina, significa “lobo” devido às lesões de pele dos pacientes assemelharem-se a mordidas de lobos. No final do século XIX, foi associado a manifestações sistêmicas pelo médico canadense Willian Osler e posteriormente foi identificada sua natureza autoimune após a observação de fagócitos englobando material nuclear livre, em amostras de medula óssea de portadores da doença. Aproximadamente, em 1950, médicos americanos desenvolveram esquemas terapêuticos baseados em corticosteróides e antimaláricos, os quais são usados até hoje ⁽¹³⁾. Atualmente, o diagnóstico de LES baseia-se em características clínicas e laboratoriais, as quais se apresentam de modo particular e heterogêneo em cada paciente. O espectro da doença varia de uma doença leve, com acometimento mucocutâneo e osteoarticular, até uma doença grave e ameaçadora à vida, podendo incluir manifestações renais e neurológicas. O ACR desenvolveu critérios de classificação para o LES, propostos em 1982 e 1997, e posteriormente revisados em 2012, pelo SLICC (Clínicas Internacionais Colaboradoras para o estudo de Lúpus Sistêmico), os quais são utilizados como instrumento auxiliar no seu diagnóstico, apesar de terem sido primariamente criados em caráter de pesquisa. Conforme descrito nestes critérios, as manifestações clínicas envolvem alterações cutâneas, articulares, renais, neurológicas, hematológicas, de serosas, além de alterações laboratoriais e imunológicas. As alterações imunológicas desempenham um papel importante no diagnóstico de LES e incluem diversos anticorpos, como os anticorpos antinuclear (FAN), anti-DNA, anti-Smith (anti-Sm) e antifosfolípidos. O FAN está presente praticamente em todos os indivíduos com LES, alcançando uma sensibilidade de 99%, entretanto apresenta baixa especificidade diagnóstica. Os critérios de classificação para o LES estão explanados na Figura 01 ^(14, 15).

1. **Eritema malar:** lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo.
2. **Lesão discóide:** lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.
3. **Fotossensibilidade:** exantema cutâneo como reação não-usual à exposição à luz solar, de acordo com a história do paciente ou observado pelo médico.
4. **Úlceras orais/nasais:** úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente indolores, observadas pelo médico.
5. **Artrite:** não-erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor e edema ou derrame articular.
6. **Serosite:** pleuris (caracterizada por história convincente de dor pleurítica, atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural) ou pericardite (documentado por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico)
7. **Comprometimento renal:** proteinúria persistente (>0,5 g/dia ou 3+) ou cilindrúria anormal.
8. **Alterações neurológicas:** convulsão (na ausência de outra causa) ou psicose (na ausência de outra causa)
9. **Alterações hematológicas:** anemia hemolítica ou leucopenia (menor que 4.000/mm³ em duas ou mais ocasiões) ou linfopenia (menor que 1.500/mm³ em duas ou mais ocasiões) ou plaquetopenia (menor que 100.000/mm³ na ausência de outra causa)
10. **Alterações imunológicas:** anticorpo anti-DNA nativo ou anti-Sm ou presença de anticorpo antifosfolípide com base em: a) níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina; b) teste positivo para anticoagulante lúpico; ou c) teste falso-positivo para sífilis, por, no mínimo, seis meses.
11. **Anticorpos antinucleares:** título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência indireta ou método equivalente, em qualquer época, e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas a síndrome do lúpus induzido por drogas.

Figura 01 - Critérios classificatórios do Lúpus Eritematoso Sistêmico pelo Colégio Americano de Reumatologia, de 1997.

Fonte: Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 1997; 40: 17-25 ⁽¹⁵⁾

Supõe-se que há peculiaridades clínicas e laboratoriais entre os pacientes, relacionadas a gênero e ancestralidade. Essas sub-populações provavelmente exibem diferentes perfis genéticos, imunológicos e, conseqüentemente, diferentes prognósticos ^(16, 17). Esses fatores podem não só influenciar a susceptibilidade para LES, mas também sua evolução clínica.

Uma metanálise recentemente realizada para comparar o impacto do gênero na evolução clínica dos pacientes identificou que manifestações como alopecia, fotossensibilidade, úlceras orais, artrite, *rash* malar, níveis de anticoagulante lúpico e queda de complemento C3 foram mais prevalentes em mulheres, ao passo que envolvimento renal, serosite, trombocitopenia e níveis de anti-DNA, mais prevalentes em homens ⁽¹⁸⁾. Outra diferença relatada foi em relação a variantes genéticas de risco, como o HLA e IRF5, as quais foram mais prevalentes em homens do que nas mulheres ⁽¹⁹⁾.

Em relação a ancestralidade, avaliações comparativas de três populações de origem geográfica e ancestralidade diferentes - européias, asiáticas e ameríndio-hispânicas – revelaram que há evidências de polimorfismos de risco compartilhados,

bem como polimorfismos únicos e peculiares de cada população ⁽⁴⁾. Através do cálculo de escores de susceptibilidade para LES, Morris *et al.* observaram que os africanos tinham os maiores escores de risco, seguidos dos asiáticos do leste, asiáticos do sul, ameríndios e por último, europeus, de forma decrescente ⁽²⁰⁾. Os indivíduos com ancestralidade afro-americana e asiática são frequentemente mais afetados por LES, bem como apresentam formas mais graves da doença, quando comparados aos de ancestralidade europeia ⁽²¹⁾. Goulielmos *et al* relataram sobre as diferenças relacionadas a patogênese do LES nas diversas ancestralidades, incluindo manifestações clínicas, variantes genéticas e níveis séricos de Interferon ⁽¹⁹⁾. Ko *et al* demonstraram que indivíduos afro-descendentes apresentam uma maior propensão de formação de auto-anticorpos, causando uma elevação da atividade de IFN- α , e isso pode explicar em parte uma maior susceptibilidade ao LES nesta população ⁽²²⁾.

Essa heterogeneidade clínico-laboratorial e da patogênese característica do LES e sua baixa incidência populacional dificultam a compreensão dos seus mecanismos fisiopatogênicos ⁽²³⁾.

3.2 Fatores de risco genéticos e ambientais

A agregação familiar e estudos genéticos em irmãos gêmeos suportam a idéia da predisposição genética no desenvolvimento de LES. Irmãos de portadores de LES apresentam um risco 29 vezes maior de desenvolver a doença do que a população geral. Irmãos gêmeos monozigóticos apresentam 10 vezes mais risco de desenvolverem LES do que irmãos gêmeos dizigóticos ⁽¹⁶⁾. Um estudo recente em Taiwan, com 23 milhões de participantes, revelou que os riscos relativos (IC 95%) para LES foram de 315,94 (210,66 - 473,82) para gêmeos dos pacientes, 23,68 (20,13 -27,84) para irmãos, 11,44 (9,74 - 13,43) para os pais, 14,42 (12.45 - 16.70) para prole e 4.44 (2.38 - 8.30) para cônjuges sem similaridade genética. Este mesmo estudo apontou que a responsabilização pela variação fenotípica do LES foi de 43,9% para o fator hereditário, 25,8% para os fatores ambientais compartilhados e 30,3% para os fatores ambientais não compartilhados ⁽²⁴⁾. Os fatores de risco genéticos geralmente não seguem um padrão de herança mendeliana. Na maioria dos casos, seguem um padrão de herança poligênica de múltiplos alelos, com

tamanho de efeito modesto, que se combinam e interagem para resultar no desenvolvimento de LES⁽¹⁶⁾.

Os fatores ambientais mais estudados de maior relevância são: exposição a radiação ultra-violeta (UV), sílica, tabagismo, hormônios, infecções, nutrição, solventes e pesticidas⁽³⁾.

Os fatores de risco genéticos interagem de forma complexa e não totalmente esclarecida com fatores de risco ambientais. Presume-se que os fatores genéticos sejam cruciais para susceptibilidade ao LES, atuando nas principais vias patogênicas do LES, e que, juntamente, com os fatores ambientais possam induzir, através de alterações epigenéticas, modificações da resposta imune inata e adaptativa, provocando ou acelerando o desenvolvimento da doença, em indivíduos susceptíveis. Essa interação potencialmente ocasiona uma desregulação do sistema imune, quebra de auto-tolerância de antígenos e manifestação do LES (Figura 02)⁽²⁵⁾.

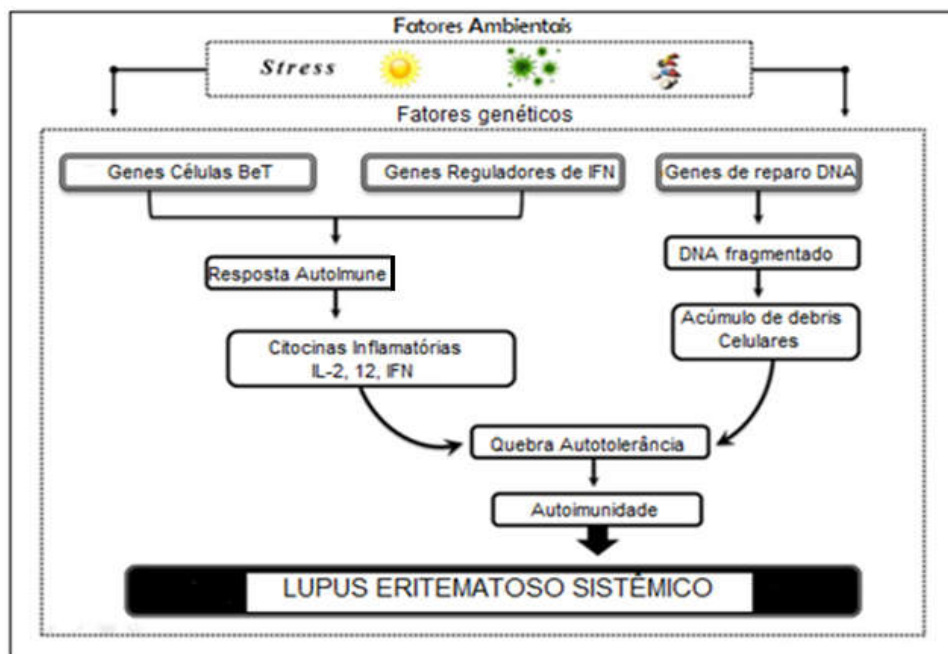


Figura 02 - Interação dos fatores ambientais e genéticos em LES

Fonte: Silva JÁ, Addobbati C, Sandrin-Garcia P, Crovella S. Systemic Lupus Erythematosus: Old and New Susceptibility Genes versus Clinical Manifestations. *Current Genomics*. 2014; 15(1): 52-65⁽²⁵⁾.

3.3 Vias fisiopatogênicas de destaque

Vários mecanismos moleculares e celulares estão envolvidos na fisiopatogênese do LES, com destaque para aqueles relacionados ao Interferon (IFN), sinalização de células B e T, *clearance* de *debris* celulares, processamento de imunocomplexos, degradação de DNA, ativação do fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), sinalização de monócitos, neutrófilos e receptores do tipo Toll ⁽¹⁶⁾.

Após os estímulos de fatores ambientais, como radiação ultra-violeta e infecções, inicia-se a desregulação e ativação do sistema imune. Devido a um ambiente pró-inflamatório associado a fatores intrínsecos celulares, as células dendríticas possuem uma maior capacidade de estimular as células T. Ocorre frequentemente uma resposta inapropriada a auto-antígenos nucleares, aumento de Interferon tipo I e conseqüente formação de imunocomplexos (resposta autoimune humoral), os quais têm uma depuração reduzida. O *clearance* reduzido de células apoptóticas também é uma importante fonte de antígenos em pacientes com LES. A presença dos anticorpos aumenta a opsonização, amplificando a resposta imune e estímulo das células T ⁽²⁶⁾. O aumento da responsividade das células T a estímulos externos é regulado por modificações epigenéticas, como a hipometilação do DNA, e influencia na secreção de citocinas e ativação de outras células. As citocinas, como IL-10, IL-21, IL-17 têm importância na perda da tolerância imune e regulação de linfócitos. A IL-2, cuja produção está reduzida em pacientes com LES, influencia no menor número de células T regulatórias no sangue periférico. As células B representam papel fundamental no LES, através da produção de anticorpos autorreativos, internalização de antígenos solúveis, apresentação de antígenos às células T e perpetuação da resposta patogênica ⁽²⁷⁾. Portanto, os indivíduos com LES apresentam uma maior ativação das respostas imunes inata, mediada pelos receptores do tipo Toll e sinalização de IFN tipo I, e adaptativa, mediada pela sinalização das células B e T ⁽¹⁹⁾.

Assim, muitos estudos avançaram na pesquisa de genes de susceptibilidade para LES, suas funções e atuações em vias patogênicas (Figura 03) ^(4, 16).

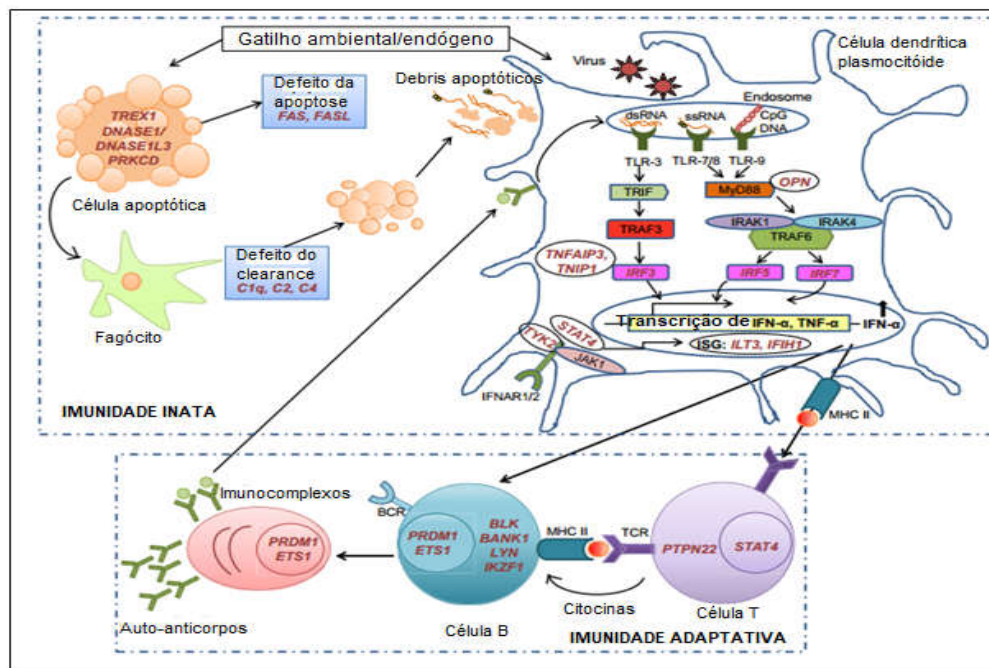


Figura 03 – Genes de susceptibilidade para LES e suas atuações nas vias patogênicas

Fonte: Ghodke-Puranik Y, Niewold TB. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. J Autoimmun. 2015; 64: 125-36 ⁽¹⁶⁾.

Silva *et al.* Classificaram os genes de susceptibilidade de acordo com sua função em quatro grupos: os que estão associados à função de células B e T, ao reparo de DNA, à produção de Interferon e mecanismos regulatórios, como demonstrado no Quadro 01 ⁽²⁵⁾. Diversos genes atuam na regulação, sobrevivência, proliferação, diferenciação e sinalização celulares, alterando e regulando funções de células B e T. Alguns deles foram associados a manifestações clínicas e imunológicas da doença ⁽²⁵⁾.

Quadro 01: Classificação de genes de risco para LES segundo seu papel fisiopatológico

Função	GENES
Regulação de células B e T	<i>IL-10, PDCD1, PTPN22, PRL, FYB, TNFSF4, RASGRP3, BANK 1, VDR, CTLA-4, HLA</i>
Reparo do DNA	<i>STK17A, XRCC 1, 3 e 4, TREX-1</i>
Produção de Interferon	<i>IRF 5, 7 e 8, STAT 4, IFIH1, TYK2, TLR 7,8 e 9, OPN</i>
Regulação de outros genes	<i>TNFAIP3, BLK, ETS1, IKZF1</i>

Abreviações: *IL-10* (Interleukin-10), *PDCD1* (Programmed cell death 1), *PTPN22* (Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22), *PRL* (Prolactina), *FYB* (Fyn binding protein), *TNFSF4* (Tumor necrosis factor ligand superfamily, member 4), *RASGRP3* (Ras guanyl nucleotide releasing proteins 3), *BANK 1* (B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1), *VDR* (Vitamin D Receptor), *CTLA-4* (Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4); *STK17A* (serine/threonine kinase), *XRCC 1, 3 e 4* (genes x-ray repair cross-complementing); *TREX-1* (Three Prime Repair Exonuclease 1), *IRF 5, 7 e 8* (Interferon Regulator Factor); *STAT 4* (Signal Transducer and Activator of Transcription 4 Protein); *IFIH1* (Interferon-induced Helicase C domain); *TYK2* (Tyrosine Kinase 2); *TLR 7, 8 e 9* (Toll-like Receptor); *OPN* (Osteopontin); *TNFAIP3* (Tumor Necrosis Factor Alpha Inducible Protein 3), *BLK* (B Lymphocyte Kinase), *ETS1* (Protein C-ets-1), *IKZF1* (Ikaros Family Zinc Finger 1)

Fonte: Ghodke-Puranik Y, Niewold TB. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015; 64: 125-36⁽¹⁶⁾. Silva JA, Addobbati C, Sandrin-Garcia P, Crovella S. Systemic Lupus Erythematosus: Old and New Susceptibility Genes versus Clinical Manifestations. *Curr Genomics.* 2014; 15(1): 52-65⁽²⁵⁾.

O reparo do DNA é importante para garantir o equilíbrio do sistema imunológico, diante de fatores externos. Fatores ambientais, como radiação ultravioleta (UV), podem gerar danos oxidativos e fragmentações das cadeias duplas de DNA, as quais podem induzir resposta imunológica contra autoantígenos. A presença de polimorfismos genéticos que levem a defeitos dos mecanismos de reparo dificulta o *clearance* dessas substâncias imunogênicas, aumentando a apoptose celular e desencadeando a resposta autoimune. Os genes relacionados a reparo do DNA são ativados por estímulos externos, como radiação UV e/ou drogas e podem, por exemplo, estar envolvidos no desenvolvimento da carcinogênese⁽²⁵⁾.

Vários estudos têm destacado o papel do interferon na fisiopatogênese e susceptibilidade ao LES⁽¹⁹⁾. O IFN- γ media a resposta Th1, sustenta ativação de células T e sobrevivência de células B. O IFN- α pode ser sintetizado por várias células em resposta a infecções, porém as mais importantes são as células dendríticas plasmocitóides, estando mais relacionado à resposta imune inata. Também foi observado maior concentração de IFN e células plasmocitóides em lesões de pele de pacientes com LES. O aumento da atividade do IFN- α em pacientes e familiares com LES são fatores de risco hereditários, e vários genes de susceptibilidade a LES estão implicados no aumento dos níveis séricos dessa molécula^(19, 28). Relatos de casos mostram que indivíduos previamente saudáveis tratados com IFN- α podem desenvolver LES, com melhora após suspensão da medicação⁽²⁵⁾.

Outros genes, responsáveis por regular a transcrição de regiões próximas, possuem função regulatória e atuam nas vias patogênicas citadas acima (regulação das células B e T, reparo do DNA e produção de Interferon)^(16, 25, 29).

3.4 Genes e polimorfismos associados a LES

Inúmeros genes foram identificados, principalmente nas últimas décadas, através dos GWAS, a abordagem mais poderosa na detecção de genes de susceptibilidade para LES. As regiões detectadas pelo GWAS ao longo do genoma são os Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos (SNPs), também denominadas Variantes de Nucleotídeos Únicas (SNVs). Os GWAS são capazes de analisar mais de 100.000 SNPs ao mesmo tempo.

O principal fator de risco genético para LES é o *HLA*, que se localiza na região Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). Sua caracterização como fator de susceptibilidade a LES foi estabelecida e confirmada em populações da Europa. Outros genes também foram analisados em caucasianos e se destacaram como uns dos principais fatores de risco: o *IRF5*, *STAT4*, *BLK* e *ITGAM* ⁽⁵⁻⁹⁾. Posteriormente, GWAS realizados em indivíduos de ancestralidade ameríndia (Estados Unidos da América e países da América – Peru, Chile, Argentina, México) e asiática confirmaram a relação entre muitos desses genes já associados a LES nas populações europeias. O primeiro GWAS em latino-americanos e norte-americanos (n=3710) foi publicado em 2016 e demonstrou que a principal associação genética com LES e com maior *Odds Ratio* (OR) foi a região do *IRF5-TNPO3*, seguido do HLA classe II nos loci *DQA2-DQB1* e *HLA-DR2*. Outros loci já conhecido associados a LES foram *ITGAM*, *STAT4*, *TNIP1*, *NCF2* e *IRAK1*. No referido estudo, também foi identificado um novo locus em 10q24.33. Os autores destacaram, entretanto, a importância do *IRF5* para os ameríndios e do HLA para os europeus, o que é atribuído a uma maior frequência dos alelos de risco nesses genes, nas respectivas populações. A maioria dos outros loci é composta por variantes comuns, encontradas em diversas ancestralidades ⁽³⁰⁾. Outro GWAS publicado mais recentemente avaliou uma população norte-americana (n=1166), com descendência europeia, e seus achados concordaram com os de populações caucasianas e asiáticas e confirmaram loci de risco para LES como a região do MHC, *STAT4* e *BLK*, de forma sequencial, mas também regiões como *IRF5/TNPO3*, *ITGAM*, *OLIG3/TNFAIP3*, *IL10*, *SNRPC/UHRF1BP1*, *IRF8*, *WDFY4* e *CREBL2/CDKN1B*. Numa segunda fase, com uma população de mais de 10.000 indivíduos, esse estudo também identificou e confirmou a participação de regiões não antes identificadas, como a região 12q12, uma região intergênica, porém de

grande importância imunológica ⁽³¹⁾. Esta região está próxima do gene codificável *PRICKLE1* e abriga o gene *IRAK4*, os quais participam na regulação da via de sinalização da WNT/beta-catenina, NFκB e do receptor de células T. O *IRAK4* influencia a resposta de células Th17, células B autorreativas e dendríticas plasmocitóides. Regiões não-codificáveis estão emergindo como importantes fatores de regulação para a expressão de genes vizinhos de forma celular ou tecidual-específica, através de uma modulação epigenética ⁽³¹⁾.

Apesar da maioria dos estudos de susceptibilidade genética ter sido realizada em populações de descendência europeia, alguns autores avaliaram indivíduos afrodescendentes americanos e confirmaram a participação de vários desses genes como *BLK*, *CTLA4*, *BANK1*, *ITGAM* e *STAT4* ⁽³²⁾. Goulielmos et al. descreveram que as variantes genéticas, como as relacionadas aos fatores reguladores de interferon (IRFs), implicadas na via dos receptores do tipo Toll foram mais proeminentes em pessoas com ancestralidade africana ⁽¹⁹⁾.

Uma metanálise de 3 GWAS em indivíduos chineses e europeus e um estudo de replicação, com mais de 35.000 participantes, revelou 11 novos loci candidatos a associação com LES, os quais tiveram alterações nos testes de expressão quantitativa e modificações epigenéticas em torno dessas regiões. Entretanto, esse estudo pôs em evidência que a maioria dos polimorfismos genéticos é compartilhada por ambas as populações ⁽²⁰⁾.

3.4.1 HLA (Antígeno Leucocitário Humano)

Os genes do *HLA* encontram-se na região do *MHC* e codificam proteínas importantes para a função do sistema imune, como moléculas de superfície celular e apresentadoras de antígenos. Possuem como característica um altíssimo polimorfismo genético que influencia a determinação da especificidade da resposta imune a todos os antígenos protéicos. Eles são avaliados como um dos mais fortes fatores de risco genéticos associados a várias doenças autoimunes, inclusive o LES. O HLA é subdividido em 3 regiões: Classe I (A, B e C), Classe II (DR, DP e DQ) e Classe III. Duas das associações clínicas mais relevantes do HLA são entre o *HLA-B27* e Espondilite Anquilosante e entre o *HLA-DRB1* e AR. No LES, as associações mais clássicas do HLA compreendem os haplótipos estendidos conhecidos como DR2 e DR3, os quais correspondem aos alelos de 4 dígitos DRB1, DQA1 e DQB1

⁽³⁰⁾. Desses, os alelos DRB1 são os mais associados a LES, como o DRB1*0301 e DRB1*0501. A região do HLA possui diversos SNPs associados a LES, confinados à região da classe II, como o rs2187668, rs9271100, rs3997854, rs3997854, rs92755772, dentre outros. Essa relação é altamente dependente e influenciada pela ancestralidade do indivíduo, conforme sugerido por diversos estudos ^(6, 7, 30, 33).

3.4.2 *IRF5* (Fator 5 Regulador de Interferon)

O gene *IRF5* tem sido associado a LES de forma estatisticamente significativa em todas as populações, especialmente a latino-americana ^(6, 30). Como o nome sugere, o *IRF5* codifica o fator 5 regulador de interferon, responsável pela regulação da expressão de Interferon e de outras citocinas pró-inflamatórias, em vários tipos celulares. O locus *IRF5* - *TNPO3* está associado a variantes funcionais que podem se combinar e gerar haplótipos e polimorfismos de risco para LES (rs2004640, rs10954213 e rs10488631) ⁽²⁵⁾. A transcrição do *IRF5* ocorre mediante ativação dos receptores de reconhecimento padrão (receptores do tipo Toll 7 e 9) e da via do interferon ^(6, 7, 16, 34-36). O *IRF5* e outros reguladores de interferon, como o *IRF7* e *IRF8*, estão associados a um risco aumentado para LES e níveis séricos aumentados de IFN Tipo I (Figura 04) ⁽³⁷⁾. O *IRF5* também foi relacionado à presença de autoanticorpos (anti-DNA, anti-Ro e anti-La) ⁽²⁵⁾.

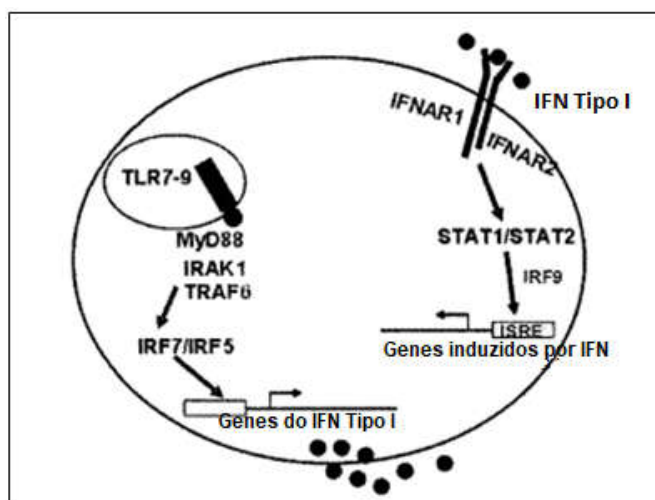


Figura 04: Participação dos IRFs e STATs na regulação de Interferon

Os IRFs e STATs participam na regulação da transcrição de IFN e genes induzidos por IFN, mediante ativação dos receptores de reconhecimento padrão (receptores do tipo Toll 7 e 9) e dos receptores de IFN tipo I, respectivamente

Abreviações: IFN: Interferon; IRF: Fator regulador de IFN; STAT: Transdutor e Ativador de Sinal de Transcrição; TLR: Receptores do tipo Toll (reconhecimento padrão); IRAK1: Cinase 1 associada a receptor de Interleucina 1; TRAF6: Fator associado a receptor de Fator de Necrose Tumoral; MyD88: Fator 88 de diferenciação mielóide; IFNAR1: Receptor 1 de interferon- $\alpha/\beta/\omega$.

Fonte: Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, et al. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(4):1065-75⁽³⁷⁾.

3.4.3 *STAT4* (Transdutor e Ativador de Sinal de Transcrição 4)

O *STAT4* foi primeiramente identificado em estudos de pacientes com Artrite Reumatóide (AR) e LES e subsequentemente foi replicado em diversas populações e GWAS. Um estudo recente em indivíduos mexicanos (n=869) testou e confirmou sua associação com LES e AR⁽³⁸⁾.

O *STAT4* é um fator de transcrição que se localiza no citoplasma celular, onde é ativado e enviado ao núcleo para regular a expressão de proteínas associadas a resposta imunológica de células T⁽³⁸⁾. As interleucinas IL-12, IL-23 e IFN- α têm o potencial de induzir a fosforilação e ativação do *STAT4*⁽¹⁶⁾, aumentando por sua vez a regulação de *STAT1* e *STAT4*, em monócitos derivados de macrófagos. As variantes do *STAT4*, assim como outras proteínas da família STAT, são associadas a LES através da via do interferon, o que leva à transcrição de genes induzidos por IFN, ativação de células inflamatórias e aumento da produção do IFN- γ (tipo II), relacionado à resposta Th1. A figura 04 exemplifica a ação do STAT 1 e 2, que após indução dos receptores de IFN tipo I, associam-se ao IRF9 e levam à ativação da transcrição de genes da via do IFN.

O *STAT4* foi associado variavelmente à presença de anticorpos anti-DNA, doença renal e LES grave^(6, 7, 39).

3.4.3 *BLK* (Quinase Linfóide B)

BLK é uma proteína tirosina-quinase, da família Scr, cuja expressão é restrita à linhagem de células B. O polimorfismo rs13277113 mapeia o intervalo entre dois genes transcritos em direções opostas o *BLK* e o *C8orf13*, este último um gene ubiquamente expresso de função desconhecida. Esse polimorfismo e suas variantes alteram significativamente a expressão do mRNA de *BLK* e *C8orf13*, aumentando o risco de desenvolvimento de LES⁽⁷⁾. Postula-se que os níveis alterados da proteína *BLK* possam influenciar os mecanismos de tolerância dos linfócitos B e

possivelmente células T imaturas, células T produtoras de IL-17 e células dendríticas plasmocitóides, levando a uma predisposição à autoimunidade sistêmica⁽⁴⁰⁾.

3.4.5 Genes associados a subfenótipos do LES

Devido à grande heterogeneidade do quadro clínico dos pacientes com LES, vários autores buscaram identificar se genes de susceptibilidade a LES também poderiam influenciar os tipos de manifestações específicas da doença como, nefrite lúpica, lúpus discóide, artrite, anticorpos anti-DNA etc. Nesses estudos, diversas associações entre genes e manifestações clínicas foram encontradas, por exemplo: *STAT4* e nefrite lúpica, LES grave, anti-DNA^(6, 7, 39, 41, 42); *HLA* e anti-Ro e anti-La⁽²⁰⁾; *IRF5* e nefrite lúpica, lesões cutâneas, anti-DNA, anti-Ro, anti-La⁽⁴¹⁾; *BLK* e nefrite lúpica⁽⁵⁾. Entretanto, essas associações ainda são controversas devido à baixa replicabilidade dos resultados entre as diversas populações.

3.4 Artropatia de Jaccoud

A AJ é uma artropatia deformante não-erosiva que foi inicialmente descrita por Jaccoud em pacientes com febre reumática (FR) com episódios recorrentes de artrite, em 1869. Posteriormente, foi relatada em pacientes com LES, sua principal associação atualmente. Também foi descrita, em menor frequência, em outras doenças do tecido conjuntivo, como síndrome de Sjogren, esclerose sistêmica, dermatomiosite, artrite psoriásica, vasculite primária, espondilite anquilosante, doença de depósito de pirofosfato, além de outras doenças não associadas ao tecido conjuntivo como neoplasia, doença inflamatória intestinal, doenças pulmonares crônicas e infecção pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana)⁽¹⁰⁾. A AJ possui uma aparência semelhante àquela de um paciente com AR, associada a deformidades reversíveis (temporariamente revertida após movimentação passiva). As alterações ocorrem principalmente em mãos, pés e joelhos, sendo característico o desvio ulnar dos dedos, quirodáctilo em pescoço de cisne, polegar em Z, isoladamente ou em combinação, em graus variáveis de comprometimento (Figura 05)⁽⁴³⁾.



Figura 05 - Artropatia de Jaccoud, forma mutilante

Fonte: Santiago MB, Machicado V, Ribeiro DS. "Mutilans-type" Jaccoud Arthropathy. *J Rheumatol.* 2015; 42(4): 725-6⁽⁴³⁾.

Os mecanismos etiopatogênicos da AJ não são conhecidos. Postula-se que a inflamação articular persistente e lesão dos tecidos periarticulares possam ser responsáveis por determinar frouxidão da cápsula articular e dos ligamentos. Alguns estudos tentaram avaliar a participação de diversas moléculas, tais como anticorpos anti-DNA, antifosfolípides, fator reumatóide, anti-colágeno tipo II, hormônio da paratireóide e interleucina-6, porém os resultados não são totalmente conclusivos⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾. Há controvérsia na literatura se a AJ tem relação direta com um maior tempo de LES⁽⁴⁷⁻⁵⁰⁾. A variável "tempo de doença" por si só também não parece justificar o desenvolvimento da AJ, pois isso, em teoria, significaria a sua presença em todos os pacientes com LES de longa ou curta duração, o que não é verdade⁽⁵⁰⁾.

Independente do seu mecanismo fisiopatológico, uma questão intrigante na AJ é porque apenas a minoria dos pacientes com LES desenvolve AJ (5%). Um aspecto pouco explorado da doença até o momento é sua eventual predisposição genética. Apenas um estudo com 340 pacientes com LES, procedentes do Japão, dos quais 9 tinham AJ, demonstrou a presença de *HLA* classe I (A 11 e B 61) em 55% dos pacientes com AJ⁽¹²⁾. Não encontramos outros estudos na literatura avaliando uma possível susceptibilidade genética de pacientes com AJ.

3.5 Justificativa do estudo

Há fortes evidências na literatura que respaldam a susceptibilidade genética para o desenvolvimento de LES. A atuação dos polimorfismos rs9271100 no gene *HLA*, rs10488631 no gene *IRF5*, rs7574865 no gene *STAT4* e rs13277113 no gene *BLK* ocorre em diferentes pontos da fisiopatogênese do LES e essa associação é estabelecida através de estudos internacionais prévios. Porém, esses genes não foram estudados em pacientes portadores de LES, em populações brasileiras, nem em portadores de AJ. Neste estudo, avaliar-se-á se esses polimorfismos aumentam a chance de desenvolvimento de LES e/ou AJ, numa população da Bahia, Brasil. Aproveitando o número de pacientes com AJ dessa coorte, esse estudo é um dos pioneiros a avaliar susceptibilidade genética nessa população. Os resultados obtidos podem contribuir para uma melhor compreensão da etiopatogenia do LES e da AJ, possibilitando novas abordagens diagnósticas, preventivas e/ou terapias futuras mais específicas e individualizadas, considerando o perfil genético do paciente.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo de caso-controle que compara a frequência de polimorfismos genéticos em duas populações - portadores de LES e indivíduos saudáveis. As prevalências desses polimorfismos também foram comparadas nos subgrupos dos pacientes portadores de LES - com ou sem AJ.

4.2 Seleção da população

4.2.1 Critérios de inclusão: foram selecionados pacientes com diagnóstico de LES, baseado nos critérios do *ACR*, revisados em 1997 ⁽¹⁵⁾, com idade acima de 18 anos. A definição dos pacientes com AJ foi baseada nos critérios propostos por Santiago⁽⁵¹⁾.

4.2.2 Critérios de exclusão: foram excluídos pacientes com sobreposição de outras doenças autoimunes do tecido conectivo.

A população-alvo é representada pelos pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico, associado ou não a Artropatia de Jaccoud. Porém, a população acessível foi composta pelos pacientes com diagnóstico de LES, com ou sem AJ, atendidos em dois serviços docente-assistenciais, especializados, do Sistema Único de Saúde, em Salvador, Bahia - os ambulatórios de Reumatologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) e do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES)/Universidade Federal da Bahia (UFBA). Foram selecionados 242 pacientes elegíveis.

Os pacientes eram convidados a participar do estudo quando compareciam ao ambulatório para realizar suas consultas, durante um período de 6 meses, com intervalo de avaliações semanais. Todos os participantes consentiram em participar do estudo após esclarecimento, leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO A). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) através do número 1.947.354 (ANEXO B).

Para compor o grupo controle, foram selecionados indivíduos sem LES. O número total de controles foi 4 vezes maior que a quantidade de casos (proporção de 4:1). Eles foram ajustados pelo sexo em relação ao grupo caso. Os controles foram selecionados através da parceria com outro projeto, em curso, *Social Changes, Asthma and Allergy in Latin America* (SCAALA), que é uma coorte de indivíduos, provenientes de Salvador - Bahia, acompanhados por comorbidades como obesidade, transtornos mentais, asma e/ou alergias. Esse projeto tem informações de genotipagem de milhares de SNPs, em seu banco de dados. Os primeiros inquéritos foram aplicados em 2005, quando os indivíduos eram crianças ou adolescentes. Atualmente, o SCAALA compõe a iniciativa EPIGEN-Brasil e tem aprovação do CEP da Universidade Federal da Bahia UFBA (registro 003-05/CEP-ISC) e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa CONEP (número do registro 15.895/2011) - ANEXO C.

4.3 Coleta de dados clínicos e laboratoriais

Os dados sócio-demográficos, as manifestações clínicas da doença, assim como os critérios classificatórios de LES dos pacientes foram coletados em sua maioria através de revisão de dados de prontuário. Entretanto, a maior parte das informações da população de AJ pôde ser coletada em tempo real, através de avaliação clínica presencial. O histórico dos exames laboratoriais foi analisado, como autoanticorpos, hemograma, função renal, sumário de urina e proteinúria de 24 horas.

4.4 Avaliação dos polimorfismos

O DNA genômico foi extraído de células mononucleares do sangue periférico usando 5 mL de sangue total através do kit Qiagen DNA Blood Mini (Valencia - CA). Foram genotipados os seguintes polimorfismos: rs9271100 do gene *HLA*, rs10488631 do gene *IRF5*, rs7574865 do gene *STAT4* e rs13277113 do gene *BLK*. Os genótipos foram determinados por técnica de PCR em tempo real através da utilização da "Taq Man SNP genotyping Assay" da Applied Biosystem (Foster City, CA), contendo sondas específicas para os alelos selvagem e mutante, e "Taq Man SNP genotyping Master Mix", seguindo-se as instruções do fabricante. A técnica de

PCR em tempo real é baseada no uso de uma sonda fluorescente, com seqüências específicas para cada alelo, onde cada sonda é marcada com um fluoróforo diferente (FAM ou VIC). Nesse sistema, a sonda se hibridiza na região complementar do DNA alvo que está localizada entre os sítios de ligação dos *primers*. Após a termociclagem, como num PCR convencional, é feita a discriminação alélica, onde quantifica-se a intensidade de emissão de cada fluoróforo, a partir da hibridização das sondas específicas para cada alelo. Se ambas as sondas emitirem fluorescência, significa que ambos os alelos (mutante e selvagem) estão presentes naquela amostra e teremos, então, um genótipo heterozigoto. Foram utilizados controles em branco e negativos para todas as reações realizadas (Figura 06). As reações foram realizadas no Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), da Fiocruz, em Salvador, Bahia, Brasil.

A genotipagem da população controle foi realizada através da Illumina Human Omni 2.5-8v1 Kit Bead Chip (Illumina, San Diego, CA), um painel comercial com 2.284.818 SNPs, do qual foram extraídas as informações dos genes *HLA*, *IRF5*, *STAT4* e *BLK* ^(52, 53).

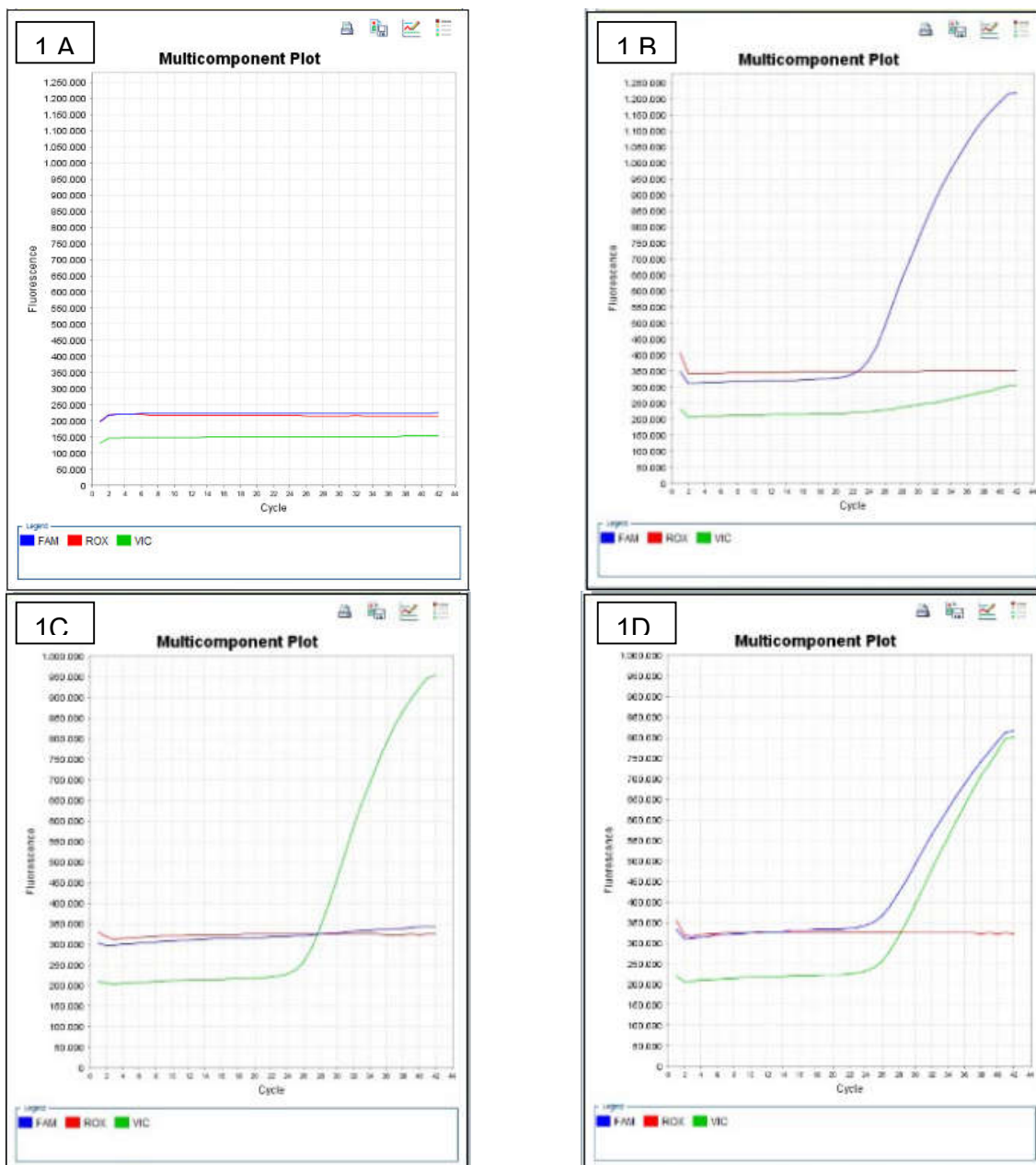


Figura 06 - Curvas dos fluoróforos (FAM/VIC) específicos para cada alelo: discriminação dos alelos mutante e selvagem

1 A. Controle em branco; 1 B. Genótipo homocigoto marcado com o fluoróforo FAM; 1 C. Genótipo homocigoto marcado com o fluoróforo VIC; 1 D. Genótipo heterocigoto marcado com FAM/VIC. Fonte: Imagens da máquina de PCR em tempo real através da utilização de "TaqManSNP genotyping Assay" da Applied Biosystem (Foster City, CA)

5 ESTATÍSTICAS

5.1 Hipóteses

A hipótese inicial do presente estudo é que os polimorfismos genéticos rs9271100 do *HLA*, rs10488631 do *IRF5*, rs7574865 do *STAT4* e rs13277113 do *BLK* estão associados com o desenvolvimento de LES e/ou AJ.

As hipóteses estatísticas, nula e alternativa, são, respectivamente:

- H0 – As freqüências dos polimorfismos genéticos em portadores de LES e AJ são semelhantes aos controles negativos (indivíduos sem LES ou sem AJ)
- H1: As freqüências dos polimorfismos genéticos em portadores de LES e AJ são diferentes dos controles negativos (indivíduos sem LES ou sem AJ)

5.2 Variáveis

As variáveis preditoras foram as freqüências alélicas e genotípicas dos polimorfismos analisados. As variáveis de desfecho foram as doenças (LES e/ou AJ) e as manifestações clínicas e laboratoriais do LES. Outras variáveis secundariamente analisadas foram relacionadas aos dados demográficos (sexo, idade, cor) dos pacientes com LES. Essas variáveis foram analisadas, quando possível, em análise multivariada por regressão logística para minimizar o viés de confusão.

5.3 Tamanho amostral

Os softwares para cálculo amostral em genética não são desenhados para serem aplicados em estudos que envolvem doenças raras, como é o caso de LES e AJ. Portanto, o cálculo do N amostral realizado pelos softwares convencionais não pôde ser aplicado com segurança na análise deste estudo. Mesmo assim, foi realizada uma estimativa do poder do estudo pós-análise, que resultou em aproximadamente 73%, para o cálculo de pacientes com LES. Esse cálculo foi realizado através da Calculadora Genetic Power ⁽⁵⁴⁾. A subpopulação de AJ foi obtida por amostra de conveniência.

5.4 Análises estatísticas

Foi utilizado o programa Statistical Package for the Social Science (SPSS Chicago – IL, versão 21) para a avaliação descritiva e comparativa dos dados demográficas, clínicos e laboratoriais dos pacientes com LES. Suas frequências foram expressas em proporções ou médias \pm desvio padrão (DP). Os testes para comparação desses dados foram os testes T de Student e o qui-quadrado.

As frequências alélicas e genotípicas dos pacientes e controles foram calculadas, utilizando-se o programa Plink (Purcell, S; Nova York- NY, versão 1.9, 2017). As avaliações sobre existência de associação entre as frequências alélicas/genotípicas e os desfechos (LES, AJ, manifestações clínicas e laboratoriais do LES) foram realizadas por meio dos cálculos de Odds Ratio, teste T de Student, Qui-quadrado e Teste de Armitage, através do programa Plink ou pelo software Stata 14. Foram utilizados os modelos de herança genética aditivo e alélico. A análise multivariada por regressão logística dos genótipos e alelos estudados foi realizada para confirmação dos resultados, com ajuste de sexo e cor. Na população com AJ foi possível ainda incluir o ajuste por idade. Um valor de p menor ou igual a 0,05 e um intervalo de confiança de 95% foram considerados como estatisticamente significantes.

6 RESULTADOS

6.1 Seleção de pacientes

Um total de 242 pacientes elegíveis portadores de LES aceitou participar do estudo. Desses, 62 foram excluídos devido à baixa concentração de DNA extraído. Outros 36 pacientes não completaram o estudo por quantidade insuficiente de reagentes para a realização da genotipagem de todos os SNPs do projeto. Um total de 144 amostras de indivíduos com LES e 614 indivíduos-controle foram genotipados, totalizando uma amostra final de 758 indivíduos (Figura 07).

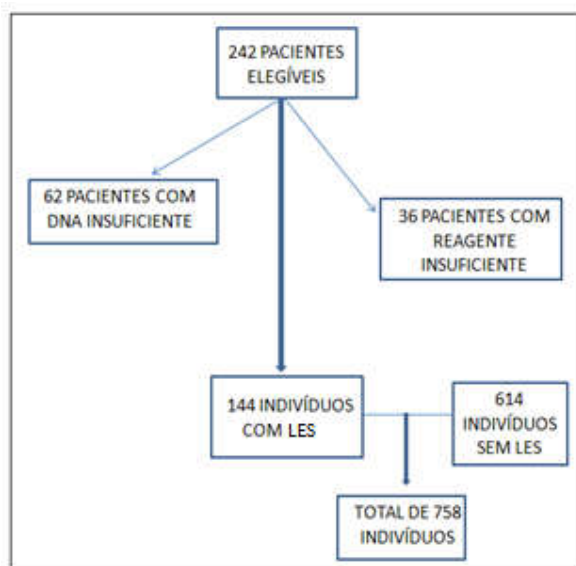


Figura 07 - Fluxograma dos indivíduos selecionados
Abreviação: LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico

6.2 Resultados descritivos e comparativos em pacientes com LES e sem LES

Os pacientes com LES e os indivíduos do grupo controle (sem LES) foram majoritariamente do sexo feminino (98%). As médias de idade para os pacientes com LES e indivíduos do grupo controle foram, respectivamente, 45 e 15 anos. Em ambos os grupos, aproximadamente 50% dos indivíduos apresentou a cor (característica fenotípica) parda. Entretanto, no grupo controle houve uma prevalência significativamente maior de pretos e menor de brancos (Tabela 01). As definições de cor da população caso (com LES) foi referida pelo médico observador

e, na população controle, foi autoreferida, porém ambos seguiram as definições do IBGE.

Tabela 1 - Características demográficas dos pacientes portadores de LES e indivíduos sem LES

	LES N (%)	Controles N (%)	Valor de P
Amostra	144	614	
Sexo Feminino	141 (98%)	602 (98%)	1,0
Média Idade (anos)	45 ± 10	15 ± 2	0,01
Característica fenotípica (Cor)			
Pretos	25/113 (22%)	190/412 (46%)	0,01
Pardos	63/113 (56%)	190/412 (46%)	
Branços	25/113 (22%)	32/412 (7%)	

Abreviações: LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico; Controles: indivíduos sem Lúpus Eritematoso Sistêmico

A partir dos resultados de genotipagem, as frequências genotípicas e alélicas dos pacientes com LES foram obtidas, conforme apresentado nas tabelas 02 e 03. As frequências dos alelos de menor frequência dos polimorfismos analisados nos genes *STAT4* e *IRF5* (alelo T referente ao polimorfismo rs7574865 no gene *STAT4* e o alelo C do polimorfismo rs10488631 no gene *IRF5*) foram 0,2263 e 0,0688, respectivamente, na população total, no presente estudo. Nos pacientes com LES, as frequências desses alelos foram, respectivamente, 30,6% e 10,2%, resultando em valores significativamente maiores nesta população, quando comparadas ao grupo controle (Tabela 02).

Tabela 02 - Frequência alélica de polimorfismos nos genes *STAT4*, *HLA*, *IRF5* e *BLK* e análise multivariada ajustada por sexo, nos pacientes portadores de LES

GENE (SNP)	CRH	ALELO	LES+ N (%)	LES- N (%)	MAF	OR	IC95%	P
STAT4 (rs7574865)	2	T	88 (30.6)	255 (20.8)	0,2263	1,67	1,25 – 2,22	0,0003
		G	200 (69.4)	973 (79.2)				
HLA (rs9271100)	6	T	77 (27.3)	277 (22.6)	0,2344	1,3	0,96 – 1,75	0,089
		C	205 (72.7)	951 (77.4)				
IRF5 (rs10488631)	7	C	26 (10.2)	76 (6.2)	0,0688	1,72	1,07 – 2,71	0,020
		T	228 (89.8)	1152 (93.8)				
BLK (rs13277113)	8	A	69 (24.5)	247 (20.1)	0,2093	1,27	0,94 – 1,71	0,105
		G	213 (75.5)	981 (79.9)				

Abreviações: SNP: Polimorfismo de Nucleotídeo Único; CRH: Cromossomo; LES+: Frequência alélica em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, LES-: Frequência alélica nos indivíduos sem Lúpus eritematoso sistêmico; MAF: Frequência alélica do alelo menos comum; OR: Odds Ratio análise univariada; IC95% Intervalo de Confiança de 95%; P: Valor de P

Os cálculos segundo herança do modelo aditivo confirmaram os resultados do modelo alélico. Para o *STAT4*, os genótipos T/T e G/T tiveram uma frequência de 11% e 39%, respectivamente. Em relação ao polimorfismo rs10488631 em *IRF5*, os genótipos C/C e C/T apresentaram uma frequência de 1% e 19%, respectivamente. Esses genótipos foram mais frequentes na população com LES (Tabela 03). Os resultados foram então ajustados em análise multivariada para sexo e cor. Após análise multivariada, o polimorfismo do *STAT4* manteve significância estatística e o *IRF5* deixou de apresentar significância estatística, em nossa população. Os SNPs analisados nos genes *HLA* e *BLK* não apresentaram associação com o desenvolvimento de LES na nossa população.

Tabela 03 - Frequência genotípica de polimorfismos nos genes *STAT4*, *HLA*, *IRF5* e *BLK* e análise multivariada ajustada por sexo e cor, nos pacientes portadores de LES

GENE (SNP)	GENO	LES+ N(%)	LES- N(%)	OR# (IC95%#)	P#	OR []] (IC95% []])	P []]
STAT4 (rs7574865)	TT	16(11,1)	25(4,1)	1,67	0,0004	1,99	5.96x10⁻⁵
	GT	56(38,9)	205(33,4)	(1,25 –		(1,42 –	
	GG	72(50)	384(62,5)	2,22)		2,7)	
HLA (rs9271100)	TT	7(5)	33(5,4)	1,3	0,087	1,41	0,051
	CT	63(45)	211(34,4)	(0,96 –		(0,99 -	
	CC	71(50,3)	370(60,2)	1,75)		2,0)	
IRF5 (rs10488631)	CC	1(1)	4 (1)	1,71	0,022	1,17	0,059
	CT	24(18,8)	68(11)	(1,07 –		(0,97 –	
	TT	102(80,2)	542(88)	2,71)		3,0)	
BLK (rs13277113)	AA	12(8,5)	27(4,4)	1,27	0,113	1,27	0,16
	AG	45(31,9)	193(31,4)	(0,94 –		(0,90 –	
	GG	84(59,6)	394(64,2)	1,71)		1,7)	

Abreviações: SNP: Polimorfismo de Nucleotídeo Único; GENO: Genótipo; LES: Frequência genotípica em Lúpus Eritematoso Sistêmico, LES-: Frequência genotípica nos controles negativos (sem LES); OR# (IC95%#): Odds Ratio e Intervalo de confiança, calculados pelo modelo de herança aditivo, análise univariada; P#: Valor de P análise univariada; OR[]] (IC95%[]]): Odds Ratio e IC95% calculados por análise multivariada, ajustado por sexo e cor; P[]]: Valor de P análise multivariada.

6.3 Associação dos polimorfismos de risco e manifestações clínicas e laboratoriais do LES

As frequências dos genótipos de menor frequência, ou seja, de risco, dos polimorfismos de *STAT4*, *HLA*, *IRF5* e *BLK* foram calculadas e comparadas entre os pacientes, segundo as manifestações clínicas do LES e presença de autoanticorpos. Porém, não foi observada nenhuma associação entre eles (Tabela 04).

Tabela 04 – Frequência dos genótipos de menor frequência em polimorfismos nos genes *STAT4*, *HLA*, *IRF5* e *BLK*, 41reqüên as manifestações clínicas e laboratoriais, nos pacientes portadores de LES

Manifestações	T/T e T/C	C/C e C/T	A/A e A/G	T/T e G/T
clínicas e laboratoriais	rs9271100 HLA	rs10488631 IRF5	rs13277113 BLK	rs7574865 STAT 4
Rash Malar	36/68 (0,28)*	12/64 (0,56)	30/70 (0,68)	35/70 (0,81)
Lesões discóides	18/29 (0,38)	5/27 (1,00)†	8/28 (0,36)	12/30 (0,31)
Fotossensibilidade	52/98 (0,52)	19/89 (0,81)	40/98 (0,77)	51/100 (0,72)
Úlceras orais	26/47 (0,53)	11/42 (0,27)	33/47 (0,33)	22/47 (0,70)
Artrite	65/126 (0,56)	24/114 (0,59)	54/127 (0,23)	66/129 (0,73)
Serosite	19/31 (0,24)	7/29 (0,22)	13/32 (0,77)	17/32 (0,96)
Nefrite	30/55 (0,64)	12/50 (0,39)	25/55 (0,21)	25/56 (0,46)
Distúrbios neuropsiquiátricos	10/18 (0,41)	5/14 (0,06)†	9/19 (0,82)	12/19 (0,33)
Alterações Hematológicas	41/89 (0,36)	18/83 (0,80)	38 /91 (0,94)	46/92 (0,94)
Anti-DNA	28/55 (0,99)	12/51 (0,33)	27/57 (0,23)	29/57 (0,84)
Anti-Sm	12/25 (0,91)	6/21 (0,23)	13/24 (0,20)	15/25 (0,23)
Anti-Ro	19/39 (0,88)	7/35 (0,48)	17/40 (0,97)	22/40 (0,42)

Frequência genotípica calculada segundo modelo de herança aditivo.

Legenda: Frequência dos genótipos de menor 41reqüência / Número de indivíduos avaliados portadores do fenótipo (valor de p, após comparação entre pacientes com fenótipo *versus* pacientes sem o fenótipo). Resultados obtidos após teste do qui-quadrado ou †por Teste exato de Fisher.

6.4 Resultados descritivos e comparativos em pacientes com LES: com e sem AJ

De uma forma geral, os pacientes com LES tinham uma média de idade de 45±10 anos. A maioria era composta por mulheres (98%) e de cor parda (56%). A média de tempo de diagnóstico de LES era em torno de 12±5 anos. Pelo menos metade dos casos apresentava, ou já apresentou em algum momento da sua evolução, fotossensibilidade, rash malar, artrite e leucopenia. Nefrite e anticorpos anti-DNA ocorreram em 43% e 49% dos pacientes, respectivamente.

Dentre os 144 pacientes com LES, havia 38 pacientes com AJ. Os perfis de ambos os subgrupos populacionais foram descritos conforme a Tabela 05. Após a análise comparativa entre os subgrupos dos pacientes com LES com e sem AJ, observou-se um maior tempo de doença na população com AJ. Serosite e

manifestações neuropsiquiátricas também foram mais prevalentes na população com AJ ($p < 0,05$). Os demais achados clínicos e laboratoriais foram semelhantes entre os grupos .

Tabela 05 - Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico, com ou sem Artropatia de Jaccoud

	LES sem AJ N/N total (%)	LES com AJ N/N total (%)	Valor de p
Amostra (N total)	106	38	
Média de Idade atual (anos)	44 ± 10	46 ± 10	0,40
Sexo Feminino	104 (98)	37 (97)	0,80
Característica fenotípica(Cor)			0,79
Parda	41 (55)	19 (58)	
Negra	18 (24)	6 (18)	
Branca	16 (21)	8 (24)	
Tempo de doença (anos)	10 ± 5	13 ± 5	0,004
Rash malar*	48 (52)	22 (61)	0,33
Lupus discóide*	26 (28)	4 (11)	0,052 †
Fotossensibilidade*	72 (75)	28 (78)	0,68
Úlceras orais*	35 (37)	12 (35)	0,84
Artrite*	93 (96)	36 (100)	0,37
Serosite*	18 (19)	14 (38)	0,02
Nefrite*	38 (40)	18 (51)	0,26
Anemia hemolítica*	15 (16)	5 (15)	0,89
Leucopenia*	50 (54)	20 (59)	0,61
Linfopenia*	42 (47)	15 (44)	0,79
Plaquetopenia*	6 (7)	2 (6)	0,87 †
Alterações neuro- psiquiátricas*	10 (11)	9 (26)	0,03
FAN*	97 (100)	36 (100)	0,18
Anti-Sm*	15 (25)	10 (29)	0,64
Anti-DNA*	36 (44)	21 (58)	0,16
Anti-Ro	23 (36)	17 (51)	0,14

* Definições dos critérios clínicos e laboratoriais classificatórios do ACR, 1997.

Abreviações: LES: Lúpus eritematoso sistêmico; FAN: Fator antinuclear; AJ: Artropatia de Jaccoud; Valor de p (por teste do qui-quadrado ou †por Teste exato de Fisher).

As freqüências alélicas e genotípicas em pacientes portadores de LES, associado a AJ, foram obtidas (Tabelas 06 e 07), seguindo os modelos alélico e aditivo, respectivamente. O alelo A do polimorfismo rs13277113 do gene *BLK* apresentou freqüência de 34,7% e os genótipos A/A e A/G 16,7% e 36,1%, respectivamente, nesta população. Eles foram mais frequentes nos pacientes com LES associado a AJ, quando comparados aos pacientes com LES sem AJ, de forma estatisticamente significativa, em análise multivariada, ajustada pelo sexo e idade.

Os demais SNPs analisados não apresentaram associação com o desenvolvimento de AJ na nossa população.

Tabela 6 - Frequência alélica de polimorfismos nos genes *STAT4*, *HLA*, *IRF5* e *BLK* e análise multivariada, ajustada por sexo e idade, nos pacientes com Artropatia de Jaccoud

GENE (SNP)	CRH	ALELO	LES+AJ+ N (%)	LES+AJ- N (%)	MAF	OR	IC95%	P
STAT4 (rs7574865)	2	T	24 (31.6)	64 (30.2)	0,2263	1,06	0,57 - 1,94	0,82
		G	52 (68.4)	148 (69.8)				
HLA (rs9271100)	6	T	24 (31.6)	53 (25.7)	0,2344	1,28	0,68 - 2,37	0,32
		C	52 (68.4)	153 (74.3)				
IRF5 (rs10488631)	7	C	5 (10)	21 (10.3)	0,0688	0,96	0,27 - 2,83	0,59
		T	45 (90)	183 (89.7)				
BLK (rs13277113)	8	A	25 (34.7)	44 (20.9)	0,2093	2,0	1,05 - 3,74	0,019
		G	47 (65.3)	166 (79.1)				

Abreviações: SNP: Polimorfismo Nucleotídeo Único; CRH: Cromossomo; LES+AJ+: Frequência alélica em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artropatia de Jaccoud, LES+AJ-: Frequência alélica nos pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico sem Artropatia de Jaccoud; MAF: Frequência alélica do alelo menos comum; OR: Odds Ratio ajustada por sexo e idade; IC95% Intervalo de Confiança de 95%; P: Valor de P (por teste do qui-quadrado).

Tabela 07 - Frequência genotípica de polimorfismos nos genes *STAT4*, *HLA*, *IRF5* e *BLK* e análise multivariada, ajustada por sexo e idade, nos pacientes com Artropatia de Jaccoud

GENE (SNP)	CRH	GENO	LES+AJ+ N (%)	LES+AJ- N (%)	OR	IC95%	P
STAT4 (rs7574865)	2	TT	6 (15.8)	10 (9.4)	1,12	0,64 - 1,95	0,67
		GT	12 (31.6)	44 (41.5)			
		GG	20 (52.6)	52 (49.1)			
HLA (rs9271100)	6	TT	3 (7.9)	4 (3.9)	1,53	0,80 - 2,91	0,19
		CT	18 (47.4)	45 (43.7)			
		CC	17 (44.7)	54 (52.4)			
IRF5 (rs10488631)	7	CC	1 (4)	0 (0)	NA	NA	NA
		CT	3 (12)	21 (20.6)			
		TT	21 (84)	81 (79.4)			
BLK (rs13277113)	8	AA	6 (16.7)	6 (5.7)	1,90	1,07 - 3,37	0,02
		AG	13 (36.1)	32 (30.5)			
		GG	17 (47.2)	67 (63.8)			

Abreviações: SNP: Polimorfismo Nucleotídeo Único; CRH: Cromossomo; GENO: Genótipo; LES+AJ+: Frequência genotípica em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artropatia de Jaccoud, LES+AJ-: Frequência genotípica nos pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico sem Artropatia de Jaccoud; OR: Odds Ratio calculada pelo modelo aditivo ajustado por sexo e idade;

IC95% Intervalo de Confiança de 95%; P: Valor de P, NA: Não-avaliado (cálculo impossibilitado devido ao baixo N amostral).

7 DISCUSSÃO

A contribuição dos fatores genéticos para o desenvolvimento de LES vem sendo abordada na literatura internacional. Na maioria dos casos familiares de LES, múltiplos alelos combinam-se e interagem com os fatores ambientais e epigenéticos, resultando na expressão e manifestação da doença ⁽¹⁶⁾. Vários genes que apresentaram uma associação com LES, em geral, tiveram uma correspondente explicação fisiopatogenética. Em nosso estudo, confirmamos a associação dos polimorfismos estudados nos genes *STAT4* e *IRF5*, em uma amostra de pacientes brasileiros com LES, conforme já detectado em outras populações, possivelmente associado à via do Interferon. O *BLK* mostrou ser um gene candidato à associação com o desenvolvimento de AJ.

Muitas doenças autoimunes apresentam-se inicialmente em estágios pré-clínicos, através da presença de biomarcadores séricos ou autoanticorpos nos pacientes, antes de se tornarem clinicamente aparentes. É um grande desafio para os pesquisadores identificarem esses indivíduos de risco em estágios pré-clínicos ⁽²³⁾. Em algumas situações, isso poderia permitir uma abordagem diferenciada do indivíduo, através de ações de caráter preventivo e/ou diagnóstico precoce. Estudos recentes propõem uma estratificação dos pacientes portadores de LES, segundo “modelos de expressão genética” de diferentes vias patogênicas. Assim, os pacientes seriam classificados conforme os seus perfis de mecanismos celulares. A *posteriori*, isso poderá servir para o tratamento personalizado do paciente ⁽⁵⁵⁾.

Após análises dos polimorfismos rs9271100, rs10488631, rs7574865 e rs13277113 dos genes *HLA*, *IRF5*, *STAT4* e *BLK*, respectivamente, observou-se que os alelos T e C dos SNPs estudados nos genes *STAT4* e *IRF5*, respectivamente, tiveram associação com LES, de forma estatisticamente significativa. Os genótipos homocigotos para esses alelos e heterocigotos também apresentaram associação com LES (OR *STAT4* rs7574865 [T] = 1,67 [IC 95% 1,25 – 2,22]; $p < 0,001$ e OR *IRF5* rs10488631 [C] = 1,71 [IC 95% 1,07 – 2,71]; $p = 0,02$).

Atualmente, a associação do *STAT4* e LES já é estabelecida em populações europeias, asiáticas e ameríndias não-brasileiros. Em nível molecular, o *STAT4* é necessário para a resposta inflamatória desencadeada por interleucinas, como IL-12, IL-23 e IFN- α , promovendo resposta Th1 e Th17 ^(16, 42). Ele é principalmente expresso no citoplasma de células T e NK (Natural Killer) e, após ativação do

receptor de IL-12, é fosforilado pelas JAK2 (Janus Quinase 2) e pela TYK2 (Tirosina Quinase 2). O STAT4 fosforilado é ativado e deslocado para o núcleo, onde induz a expressão de moléculas pró-inflamatórias como o IFN- γ ^(38, 42). Hagber et al. recentemente identificaram que as células T de pacientes carregando o alelo de menor frequência SNP rs7574865 [T] no gene *STAT4* exibem uma alta resposta à IL-12 e ao IFN- α , revelando um importante mecanismo de atuação do STAT4. Além disso, o estudo sugeriu que o tratamento com inibidores da JAK pode ser benéfico nesse grupo de pacientes, pois inibiu a ativação celular pela IL-12 *in vitro* ⁽⁴²⁾. Dessa forma, futuros alvos terapêuticos moleculares poderão ser guiados pelo risco genético do paciente. Kariuki et al. também encontrou a associação do alelo de risco do *STAT4* com o aumento da expressão de genes induzidos por IFN- α , a despeito de estar associado a baixos níveis séricos de IFN- α (tipo I) ⁽⁵⁶⁾. Em nosso estudo, observamos um aumento estatisticamente significativo da frequência do alelo T em pacientes com LES quando comparados com os indivíduos sem LES, o que poderia sugerir que a presença desse alelo, através do aumento da resposta dos linfócitos T à IL-12 e ao IFN- α , estaria relacionada ao desenvolvimento de LES.

Em pacientes com ascendência norte e sul-americana, o IRF5 é provavelmente a mais forte associação genética com LES, fora da região do MHC ^(6, 30). Ele codifica o fator 5 regulador de interferon, um fator de transcrição, envolvido na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- α e genes induzidos por IFN- α , em diferentes tipos celulares, como células dendríticas, macrófagos e células B ⁽³⁵⁾. O IRF5 é associado a níveis séricos elevados de Interferon. Células dendríticas produzem IFN- α em resposta à incubação com soro rico em imunocomplexos de pacientes com LES, especialmente os que têm o haplótipo de risco do IRF5 (rs2004640, rs10954213 e rs10488631) ⁽³⁷⁾. O haplótipo de risco do IRF5 está associado com atividade sérica de IFN- α aumentada em pacientes com LES, e seu efeito é maior em pacientes positivos para anticorpos anti-DNA, anti-Ro e anti-Sm ⁽⁵⁷⁾. Foi demonstrada uma possível interação epistática entre *IRF5* e *STAT4*, levando à susceptibilidade de doenças auto-imunes associadas à via do IFN tipo-1, como LES e AR ⁽⁵⁸⁾. Os IRFs também estão implicados na patogênese de outras doenças autoimunes, como esclerose múltipla, síndrome de Sjogren, esclerose sistêmica, doença inflamatória intestinal ^(6, 7, 16, 34-36). Nesse estudo, o alelo C do SNP rs10488631, presente no gene *IRF5*, apresentou uma associação com o desenvolvimento de LES, porém os demais SNPs do haplótipo de risco para o

desenvolvimento de LES (rs2004640 e rs10954213) não foram analisados. Dessa forma, é possível que o SNP rs10488631 esteja associado, não isoladamente, mas em conjunto com outros polimorfismos que levam ao aumento da produção de IFN- α em células dendríticas, o que, por sua vez, poderia desencadear o desenvolvimento de LES.

O IFN tipo I atua de diversas formas na patogênese do LES, como: estimulação e diferenciação das células dendríticas, redução da apoptose celular e clearance de antígenos; aumento da expressão de genes relacionados a IFN, principalmente em monócitos e neutrófilos, regulação de células T^(59, 60). No LES, há uma associação entre diversos genes relacionados à susceptibilidade à doença e a expressão e/ou responsividade celular ao IFN tipo I, como demonstrado com o *IRF5* e *STAT4*. Portanto, devido à importância do IFN e da desregulação da imunidade inata no desenvolvimento do LES, estudos clínicos têm avaliado novas drogas que tenham o IFN como alvo. Por exemplo, os anticorpos monoclonais anti-IFN- α (rontalizumabe e sifalimumabe) e anti-receptor de IFN- α (anifrolumabe) parecem demonstrar segurança e eficácia em estudos de fases iniciais do tratamento de pacientes portadores de LES, porém os resultados ainda são controversos⁽⁶¹⁾. Houve maior incidência de infecções e herpes-zoster nos ensaios clínicos. Assim, ainda é necessário analisar o risco-benefício do tratamento a longo prazo e os pacientes selecionáveis para o tratamento. Parece que o efeito dessas drogas é influenciado pelo perfil do IFN- α do paciente, o que está sendo avaliado como possível biomarcador de resposta terapêutica dessas drogas⁽⁶²⁾. A busca pelo desenvolvimento de drogas que atinjam células plasmocitóides e receptores do tipo Toll também parece relevante devido a sua participação na produção de IFN⁽⁶¹⁾.

Após o ajuste para cor e sexo, somente o polimorfismo no gene *STAT4* manteve a associação descrita previamente com o desenvolvimento de LES em nossa população. A maioria dos estudos genéticos não faz ajuste dos resultados para cor, porém devido à população brasileira apresentar elevada miscigenação e maior prevalência de pretos (afrodescendentes) optamos por fazê-lo. Entretanto, 30% dos pacientes do grupo controle e 20% dos pacientes com LES não tinham dados disponíveis sobre a cor da pele, reduzindo o N amostral e, portanto, o poder da análise multivariada ajustada por cor, o que foi uma limitação desta análise. Sanchez et al. descreveram freqüências dos alelos de risco dos polimorfismos rs7574865 do *STAT4* e rs13277113 do *BLK* de 16,8% e 17,2%, respectivamente,

numa população de afrodescendentes americanos portadores de LES ⁽³²⁾. Já em nossa população, suas frequências foram 22,6% e 20,9%, respectivamente, o que mostra valores percentuais maiores e destaca a importância de se estudar as diversas populações individualmente.

De acordo com uma grande metanálise envolvendo mais de 35.000 pacientes asiáticos e europeus, a maioria dos polimorfismos genéticos de risco para LES está contida dentro de regiões compartilhadas por ambas as populações, como por exemplo, a região do *STAT4*. A região do *HLA* e, em menor grau, o *IRF5*, entretanto, apresentam heterogeneidade transancestral significativa ⁽²⁰⁾. Na população europeia, por exemplo, o polimorfismo rs2187668 do *HLA*, preditor do alelo *DRB1*0301*, teve forte associação com LES ⁽⁷⁾. Em GWAS de populações asiáticas, identificaram-se regiões importantes, próximas ao rs9271100 do *HLA-DRB1* e ao rs3997854 do *HLA-DQA2*, semelhante aos achados nos europeus ⁽⁶⁾. Em ameríndios, vários polimorfismos da região do *HLA* classe II foram associados LES, com destaque para os *loci DQA2-DQB1* (rs92755772) e *DRB1-DQA1* (rs9271366). Diferentemente dos europeus, não houve associação do *DRB1*0301* (rs2187668) com o desenvolvimento de LES nos ameríndios ⁽³⁰⁾. Assim, a despeito da ausência de associação do polimorfismo rs9271100 do *HLA* e LES em nossa amostra, existem evidências que outros polimorfismos desta região tão importante estejam associados à doença e variem amplamente com a ancestralidade. Certamente, devem existir outros SNPs pertencentes à região do *HLA*, que não puderam ser avaliados no presente projeto, e são fatores de risco para LES em nossa população.

Ao analisarmos somente os pacientes portadores de LES e seus dois subgrupos, com ou sem AJ, notamos algumas diferenças clínicas entre eles. O tempo de doença, a prevalência de serosite e acometimento neuropsiquiátrico (neurológico e/ou psiquiátrico) foram maiores na população com AJ. Não há na literatura evidência suficiente para afirmar a existência de manifestações clínicas mais comuns em pacientes com AJ. Alguns autores descreveram uma associação negativa com nefrite lúpica e positiva com artrite ^(47, 63, 64). No presente estudo, não houve diferença do perfil de autoanticorpos entre pacientes com AJ e sem AJ. Na literatura já foi evidenciado associação com marcadores como anti-DNA, anti-Ro, antifosfolípidos e fator reumatóide porém os resultados ainda são controversos ⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾. Além disso, grande parte dos autores revelou que a AJ ocorreu tardiamente na evolução do LES (média de 10 anos a partir do diagnóstico de LES) na população

adulta. Porém, isso não foi confirmado em outro estudo com maior número de pacientes com AJ, que apontou inclusive para maior risco nos pacientes com menor tempo de doença ⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾. Em nosso estudo e de acordo com a observação da maioria dos autores, os pacientes com LES e AJ tiveram maior tempo de diagnóstico de LES quando comparado àqueles sem AJ, de forma estatisticamente significativa (13 anos x 10 anos, respectivamente, $p = 0,02$). Piga *et al.* realizaram um estudo prospectivo e descreveram que a inflamação articular e tendínea prolongadas e o maior tempo de doença foram associados com maior risco para desenvolvimento de AJ. Eles sugerem que a AJ pode não ser um subtipo distinto de artrite do LES, mas uma complicação consequente à falência terapêutica ⁽⁶⁵⁾. Esta hipótese é corroborada por um estudo recente realizado por este grupo de pesquisa, que demonstrou que metade dos pacientes com AJ tinha inflamação ativa articular e periarticular detectadas por métodos de ultrassom, de forma subclínica e sem associação com outros sinais sistêmicos ⁽⁶⁶⁾. A detecção de uma provável associação genética relacionada a AJ acrescenta a esse princípio o fator da susceptibilidade genética, de forma equivalente ao que acontece na artrite reumatóide.

O presente estudo aponta para uma possível associação genética entre AJ e o polimorfismo rs1327713 do gene *BLK*, o qual codifica uma tirosina-quinase não-receptora, da família *Scr*, que está envolvida na sinalização, desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos B. Suas variantes estão associadas a LES e outras doenças autoimunes ⁽⁶⁷⁾. O polimorfismo rs13277113 representa uma região situada entre o *BLK* e o *C8orf13*, um gene de função desconhecida. Esse polimorfismo e suas variantes reduzem significativamente a expressão do RNA mensageiro do *BLK*, aumentando o risco de desenvolvimento de LES ⁽⁷⁾. Postula-se que os níveis alterados da proteína *BLK* possam influenciar os mecanismos de tolerância dos linfócitos B, e possivelmente células T, Th-17 e células dendríticas plasmocitóides. Foi descrito também que o *BLK* aumentou interações entre outros genes, *BANK1* e *PLCg1*, após ativação de células B, tendo portanto um papel regulatório ⁽⁶⁸⁾. Nenhum outro estudo anterior avaliou uma possível causa genética para AJ, exceto um, que avaliou 9 pacientes japoneses com AJ e encontrou a presença de *HLA* classe I (A11 e B61) em 55% dos pacientes ⁽¹²⁾. A possível associação do polimorfismo rs1327713 do gene *BLK* com AJ pode levantar hipóteses sobre sua fisiopatogênese, como as células B, através ou não da formação de imunocomplexos, e deve ser comprovado em estudos posteriores.

A literatura revela muitos estudos sugerindo a existência de uma predisposição genética para determinados fenótipos do LES, tendo os genes um possível papel no prognóstico e evolução dos pacientes, porém isso ainda não foi confirmado. Há uma grande diversidade de associações descritas na literatura, que variam conforme a ancestralidade da população estudada. Dos genes avaliados neste estudo, todos já apresentaram alguma associação com manifestações do LES descrita na literatura. O *STAT4* foi associado em vários estudos com a presença de nefrite lúpica, insuficiência renal, LES grave e presença de anticorpos anti-DNA ^(6, 7, 39, 41, 42, 69). Também foi associado a idade precoce do diagnóstico e com anticorpos anti-Sm ^(39, 70). O *IRF5*, por sua vez, foi associado a nefrite lúpica, manifestações cutâneas e autoanticorpos como o anti-DNA, anti-Ro e anti-La ^(25, 41). O *BLK* também foi associado a nefrite lúpica ⁽⁵⁾. Esses resultados põem em dúvida se os genes têm algum papel no prognóstico e evolução dos pacientes com LES, o que é questionado por alguns autores devido ao baixo poder de replicação dos estudos em populações de diferentes ancestralidades ⁽⁶⁾. Em nossa população, não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre os polimorfismos analisados dos genes *STAT4*, *HLA*, *IRF5* e *BLK* e as manifestações clínicas e alterações laboratoriais clássicas de LES. Dessa forma, a confirmação da associação genética dos polimorfismos e as manifestações específicas do LES requer estudos com poder mais elevado de replicação.

No que diz respeito à avaliação e descoberta de genes de risco para o LES, os principais limitantes dos estudos de associação e suas dificuldades metodológicas são o desequilíbrio de ligação dos polimorfismos e comparações múltiplas ⁽²³⁾. Muitos SNPs e genes associados a LES podem não representar causalidade quando analisados de forma isolada. Assim, é importante a compreensão da regulação dos SNPs e da sua expressão genética, papel causal e funcional na patogênese do LES. Além disso, muitos genes associados a LES localizam-se em regiões não codificáveis ou são seletivamente codificados em tipos específicos celulares ⁽⁷¹⁾. Foi demonstrado um papel regulatório dessas regiões não-codificáveis, através de efeitos epigenéticos, interferindo em fatores de transcrição do sistema imune, apoptose, regulação de células T, B e T-regulatórias (T-reg) ^(72, 73). As alterações epigenéticas são importantes mecanismos regulatórios e atualmente muito estudados. Os fenômenos epigenéticos não alteram as sequências nucleotídicas e são herdáveis. Eles incluem: acetilação, modificação de histonas,

metilação, fosforilação, microRNA (moléculas pequenas de RNA endógeno não-codificável), reativação do cromossomo X. Zhu *et al.* fizeram uma análise integrada do perfil de expressão genética e metilação do DNA. Foi demonstrado que 334 genes super-expressos estavam hipometilados e 479 genes pouco expressos, hipermetilados. Eles encontraram ainda um aumento das vias de sinalização do TLRs e IFN e citocinas próinflamatórias, principalmente associadas à nefrite lúpica ⁽⁷⁴⁾. Genes reguladores do Interferon são desmetilados e estas alterações precedem a transcrição gênica, sugerindo um fenômeno precoce da doença ⁽⁷⁵⁾. Estudos reportaram hipometilação do DNA próximo a genes associados a IFN tipo I, em células T CD4 de pacientes com LES ⁽⁶⁰⁾. Em geral, o processo de metilação pode ser influenciado ou induzido por fenômenos ambientais, como radiação UV, drogas indutoras de lúpus e idade. Isso representa um importante elo entre fatores genéticos e ambientais. Portanto, os mecanismos epigenéticos impactam na expressão e função dos genes envolvidos no LES ^(16, 23). Assim, podemos perceber a importância da pesquisa de marcadores genéticos de risco para LES e AJ, os quais em associação com outros fatores de risco ambientais e epigenéticos podem culminar na manifestação da doença.

8 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Sobre o estudo atual, a falta de ajuste por idade pode ter sido um fator limitante. Porém, apesar do grupo controle (sem LES) ser composto por adolescentes, a idade provavelmente não teve relevância para análise dos dados, por tratar-se de polimorfismos herdados (o indivíduo já nasce com sua carga genética completa) e, principalmente, pela baixíssima incidência da doença na população geral (1 a 10 casos por 100.000 habitantes). Desta maneira, seria necessário aproximadamente 100.000 indivíduos para a incidência de 1 caso de LES no grupo controle.

As formas de definição de cor da pele dos indivíduos foram diferentes entre os grupos com LES (médico avaliador) e sem LES (cor auto-referida). Isso foi um ponto negativo do trabalho, pois não permitiu a uniformização dos métodos de avaliação. Além disso, cerca de 30% dos indivíduos do grupo controle e 20% do grupo de pacientes com LES não tinham dados disponíveis sobre a cor da pele, reduzindo o poder da análise pós-ajuste por cor. Desta forma, apesar da cor da pele poder ser uma variável de confusão, já que a prevalência de LES é maior em negros do que brancos, houve limitação da análise desta variável. Mesmo assim, a prevalência de negros foi maior no grupo controle em relação ao grupo caso (46% x 22%), o que diminuiu a possibilidade de confundimento.

Outro fator limitante no nosso trabalho foi o tamanho amostral, principalmente dos pacientes portadores de AJ. Porém, devido à raridade dessa enfermidade consideramos relevante o N amostral estudado. Assim, os resultados não permitem conclusões finais definitivas sobre a susceptibilidade genética de AJ, mas sugerem uma possível associação com polimorfismo rs13277113 do gene *BLK*. Por ser um trabalho retrospectivo, com muitos dados obtidos por revisão de prontuário, alguns dados clínicos e laboratoriais de pacientes foram perdidos, o que também reduziu os dados da amostra.

Os achados do presente estudo podem ampliar a compreensão de possíveis marcadores genéticos para LES e AJ e possibilitar a criação de medidas de caráter preventivo, diagnóstico ou terapêutico, de forma precoce, nos pacientes “de risco”. Um maior conhecimento da patogênese dessas doenças pode viabilizar um tratamento mais individualizado, personalizado e eficiente para o paciente. Outros estudos com maior N amostral devem reanalisar se há relação entre os

polimorfismos e as manifestações específicas do LES, como a AJ. Além disso, estudos complementares são importantes para avaliar e entender como os mecanismos ambientais e epigenéticos impactam na expressão e função de genes associados a LES.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso trabalho é pioneiro ao avaliar polimorfismos fora e dentro da região MHC, em pacientes brasileiros com LES e AJ. Os polimorfismos rs7574865 e rs10488631 dos genes *STAT4* e *IRF5* apresentaram associação com o desenvolvimento de LES, confirmando os achados prévios de populações de diferentes ancestralidades. O polimorfismo estudado rs9271100 do gene *HLA* não apresentou correlação com LES ou AJ em nossa população, o que pode ser explicado por sua heterogeneidade transancestral. O polimorfismo rs13277113 do gene *BLK* apresentou uma possível associação com a presença de AJ, presumindo-se, dessa forma, alguma participação das células B em sua fisiopatogênese.

REFERÊNCIAS

1. Costi LR, Iwamoto HM, Neves DCO, Caldas CAM. Mortality from systemic erythematosus lupus in Brazil: evaluation of causes according to the government health database. *Rev Bras Reumatol Engl Ed.* 2017; 57(6): 574-82.
2. Pons-Estel GJ, Alarcon GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 2010; 39(4): 257-68.
3. Parks CG, de Souza Espindola Santos A, Barbhaiya M, Costenbader KH. Understanding the role of environmental factors in the development of systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2017; 31(3): 306-20.
4. Chen L, Morris DL, Vyse TJ. Genetic advances in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol.* 2017; 29(5): 423-33.
5. Ruiz-Larranaga O, Migliorini P, Uribarri M, Czirjak L, Alcaro MC, Del Amo J, et al. Genetic association study of systemic lupus erythematosus and disease subphenotypes in European populations. *Clin Rheumatol.* 2016; 35(5): 1161-8.
6. Teruel M, Alarcon-Riquelme ME. The genetic basis of systemic lupus erythematosus: What are the risk factors and what have we learned. *J Autoimmun.* 2016; 74: 161-75.
7. Hom G, Graham RR, Modrek B, Taylor KE, Ortmann W, Garnier S, et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med.* 2008; 358(9): 900-9.
8. International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus G, Harley JB, Alarcon-Riquelme ME, Criswell LA, Jacob CO, Kimberly RP, et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet.* 2008; 40(2): 204-10.
9. Graham RR, Cotsapas C, Davies L, Hackett R, Lessard CJ, Leon JM, et al. Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2008; 40(9): 1059-61.
10. Santiago MB, Galvao V. Jaccoud arthropathy in systemic lupus erythematosus: analysis of clinical characteristics and review of the literature. *Medicine.* 2008; 87(1): 37-44.
11. Santiago MB, Galvao V, Ribeiro DS, Santos WD, da Hora PR, Mota AP, et al. Severe Jaccoud's arthropathy in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 2015; 35(10): 1773-7.

12. Takeishi M, Mimori A, Suzuki T. Clinical and immunological features of systemic lupus erythematosus complicated by Jaccoud's arthropathy. *Mod Rheumatol*. 2001; 11(1): 47-51.
13. Barnett R. Systemic lupus erythematosus. *Lancet*. 2016; 387(10029): 1711.
14. Petri M, Orbai AM, Alarcon GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012; 64(8): 2677-86.
15. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997; 40(9): 1725.
16. Ghodke-Puranik Y, Niewold TB. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2015; 64: 125-36.
17. Weckerle CE, Niewold TB. The unexplained female predominance of systemic lupus erythematosus: clues from genetic and cytokine studies. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011; 40(1): 42-9.
18. Boodhoo KD, Liu S, Zuo X. Impact of sex disparities on the clinical manifestations in patients with systemic lupus erythematosus: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*. 2016; 95(29): e4272.
19. Goulielmos GN, Zervou MI, Vazgiourakis VM, Ghodke-Puranik Y, Garyfallos A, Niewold TB. The genetics and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) in populations of different ancestry. *Gene*. 2018; 668: 59-72.
20. Morris DL, Sheng Y, Zhang Y, Wang YF, Zhu Z, Tomblinson P, et al. Genome-wide association meta-analysis in Chinese and European individuals identifies ten new loci associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2016; 48(8): 940-6.
21. Petri M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2002; 16(5): 847-58.
22. Ko K, Koldobskaya Y, Rosenzweig E, Niewold TB. Activation of the Interferon Pathway is Dependent Upon Autoantibodies in African-American SLE Patients, but Not in European-American SLE Patients. *Front Immunol*. 2013; 4: 309.
23. Sparks JA, Costenbader KH. Genetics, environment, and gene-environment interactions in the development of systemic rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am*. 2014; 40(4): 637-57.
24. Kuo CF, Grainge MJ, Valdes AM, See LC, Luo SF, Yu KH, et al. Familial Aggregation of Systemic Lupus Erythematosus and Coaggregation of Autoimmune Diseases in Affected Families. *JAMA Intern Med*. 2015; 175(9): 1518-26.

25. Silva JdA, Addobbati C, Sandrin-Garcia P, Crovella S. Systemic Lupus Erythematosus: Old and New Susceptibility Genes versus Clinical Manifestations. *Current genomics*. 2014; 15(1): 52-65.
26. Frisoni L, McPhie L, Colonna L, Sriram U, Monestier M, Gallucci S, et al. Nuclear autoantigen translocation and autoantibody opsonization lead to increased dendritic cell phagocytosis and presentation of nuclear antigens: a novel pathogenic pathway for autoimmunity? *J immunol*. 2005; 175(4): 2692-701.
27. Shlomchik MJ, Craft JE, Mamula MJ. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nature Rev Immunol*. 2001; 1(2): 147-53.
28. Niewold TB, Hua J, Lehman TJ, Harley JB, Crow MK. High serum IFN-alpha activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*. 2007; 8(6): 492-502.
29. Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Disco*. 2010; 9(4): 293-307.
30. Alarcon-Riquelme ME, Ziegler JT, Molineros J, Howard TD, Moreno-Estrada A, Sanchez-Rodriguez E, et al. Genome-Wide Association Study in an Amerindian Ancestry Population Reveals Novel Systemic Lupus Erythematosus Risk Loci and the Role of European Admixture. *Arthritis Rheumatol*. 2016; 68(4): 932-43.
31. Demirci FY, Wang X, Kelly JA, Morris DL, Barmada MM, Feingold E, et al. Identification of a New Susceptibility Locus for Systemic Lupus Erythematosus on Chromosome 12 in Individuals of European Ancestry. *Arthritis Rheumatol*. 2016; 68(1): 174-83.
32. Sanchez E, Comeau ME, Freedman BI, Kelly JA, Kaufman KM, Langefeld CD, et al. Identification of novel genetic susceptibility loci in African American lupus patients in a candidate gene association study. *Arthritis Rheum*. 2011; 63(11): 3493-501.
33. Shankarkumar U, Ghosh K, Badakere SS, Mohanty D. HLA-DRB1*03 and DQB1*0302 associations in a subset of patients severely affected with systemic lupus erythematosus from western India. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62(1): 92-3.
34. Sigurdsson S, Nordmark G, Goring HH, Lindroos K, Wiman AC, Sturfelt G, et al. Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet*. 2005; 76(3): 528-37.
35. Kottyan LC, Zoller EE, Bene J, Lu X, Kelly JA, Rupert AM, et al. The IRF5-TNPO3 association with systemic lupus erythematosus has two components that other autoimmune disorders variably share. *Hum Mol Genet*. 2015; 24(2): 582-96.
36. Tang L, Chen B, Ma B, Nie S. Association between IRF5 polymorphisms and autoimmune diseases: a meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2014; 13(2): 4473-85.

37. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, et al. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(4): 1065-75.
38. Beltran Ramirez O, Mendoza Rincon JF, Barbosa Cobos RE, Aleman Avila I, Ramirez Bello J. STAT4 confers risk for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Mexican patients. *Immunol Lett.* 2016; 175: 40-3.
39. Taylor KE, Remmers EF, Lee AT, Ortmann WA, Plenge RM, Tian C, et al. Specificity of the STAT4 genetic association for severe disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet.* 2008; 4(5): e1000084.
40. Guthridge JM, Lu R, Sun H, Sun C, Wiley GB, Dominguez N, et al. Two functional lupus-associated BLK promoter variants control cell-type- and developmental-stage-specific transcription. *Am J Hum Genet.* 2014; 94(4): 586-98.
41. Ceccarelli F, Perricone C, Borgiani P, Ciccacci C, Rufini S, Cipriano E, et al. Genetic Factors in Systemic Lupus Erythematosus: Contribution to Disease Phenotype. *J Immunol Res.* 2015; 2015: 745647.
42. Hagberg N, Joelsson M, Leonard D, Reid S, Eloranta ML, Mo J, et al. The STAT4 SLE risk allele rs7574865[T] is associated with increased IL-12-induced IFN-gamma production in T cells from patients with SLE. *Ann Rheum Dis.* 2018; 77(7): 1070-7.
43. Santiago MB, Machicado V, Ribeiro DS. "Mutilans-type" Jaccoud Arthropathy. *J Rheumatol.* 2015; 42(4): 725-6.
44. Galvao V, Atta AM, Sousa Atta ML, Motta M, Dourado S, Grimaldi L, et al. Profile of autoantibodies in Jaccoud's arthropathy. *Joint Bone Spine.* 2009; 76(4): 356-60.
45. Choi EK, Gatenby PA, Bateman JF, Cole WG. Antibodies to type II collagen in SLE: a role in the pathogenesis of deforming arthritis? *Immunol Cell Biol.* 1990; 68(Pt 1): 27-31.
46. Babini SM, Cocco JA, de la Sota M, Babini JC, Arturi A, Marcos JC, et al. Tendinous laxity and Jaccoud's syndrome in patients with systemic lupus erythematosus. Possible role of secondary hyperparathyroidism. *J Rheumatol.* 1989; 16(4): 494-8.
47. Skare TL, Godoi Ade L, Ferreira VO. Jaccoud arthropathy in systemic lupus erythematosus: clinical and serological findings. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 2012; 58(4): 489-92.
48. Esdaile JM, Danoff D, Rosenthal L, Gutkowski A. Deforming arthritis in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 1981; 40(2): 124-6.

49. Alarcon-Segovia D, Abud-Mendoza C, Diaz-Jouanen E, Iglesias A, De los Reyes V, Hernandez-Ortiz J. Deforming arthropathy of the hands in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1988; 15(1): 65-9.
50. Santiago MB. Miscellaneous non-inflammatory musculoskeletal conditions. Jaccoud's arthropathy. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2011; 25(5): 715-25.
51. Santiago MB. Jaccoud's arthropathy: proper classification criteria and treatment are still needed. *Rheumatol Int.* 2013; 33(11): 2953-4.
52. Marques CR, Costa GN, da Silva TM, Oliveira P, Cruz AA, Alcantara-Neves NM, et al. Suggestive association between variants in IL1RAPL and asthma symptoms in Latin American children. *European journal of human genetics : EJHG.* 2017; 25(4): 439-45.
53. Kehdy FS, Gouveia MH, Machado M, Magalhaes WC, Horimoto AR, Horta BL, et al. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112(28): 8696-701.
54. Purcell S, Cherny SS, Sham PC. Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics.* 2003; 19(1): 149-50.
55. Barturen G, Alarcon-Riquelme ME. Systemic Lupus Erythematosus in 2016: Gene expression profiling comes closer to the clinic. *Nat Rev Rheumatol.* 2017; 13(2): 69-70.
56. Kariuki SN, Moore JG, Kirou KA, Crow MK, Utset TO, Niewold TB. Age- and gender-specific modulation of serum osteopontin and interferon-alpha by osteopontin genotype in systemic lupus erythematosus. *Genes immun.* 2009; 10(5): 487-94.
57. Niewold TB. Interferon alpha-induced lupus: proof of principle. *J Clin Rheumatol.* 2008; 14(3): 131-2.
58. Kim K, Cho SK, Han TU, Kim JH, Kang SJ, Kang C, et al. A redundant epistatic interaction between IRF5 and STAT4 of the type I interferon pathway in susceptibility to lupus and rheumatoid arthritis. *Lupus.* 2013; 22(13): 1336-40.
59. Munoz LE, van Bavel C, Franz S, Berden J, Herrmann M, van der Vlag J. Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2008; 17(5): 371-5.
60. Flint SM, Jovanovic V, Teo BW, Mak A, Thumboo J, McKinney EF, et al. Leucocyte subset-specific type 1 interferon signatures in SLE and other immune-mediated diseases. *RMD open.* 2016; 2(1): e000183.
61. Kalunian KC. Interferon-targeted therapy in systemic lupus erythematosus: Is this an alternative to targeting B and T cells? *Lupus.* 2016; 25(10): 1097-101.

62. Massarotti EM, Allore HG, Costenbader K. Editorial: Interferon-Targeted Therapy for Systemic Lupus Erythematosus: Are the Trials on Target? *Arthritis Rheumatol.* 2017; 69(2): 245-8.
63. Lhakum P, Kasitanon N, Sivasomboon C, Wangkaew S, Louthrenoo W. Deforming Arthropathy in Thai Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Rheumatol.* 2016; 22(1): 1-7.
64. Kolasinski SL, Chi AS, Lopez-Garib AJ. Current Perspectives on Imaging for Systemic Lupus Erythematosus, Systemic Sclerosis, and Dermatomyositis/Polymyositis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2016; 42(4): 711-32.
65. Piga M, Gabba A, Congia M, Figus F, Cauli A, Mathieu A. Predictors of musculoskeletal flares and Jaccouds arthropathy in patients with systemic lupus erythematosus: A 5-year prospective study. *Semin Arthritis Rheumatism.* 2016; 46(2): 217-24.
66. Lins CF, de Sa Ribeiro DL, Santos WGD, Rosa G, Machicado V, Pedreira AL, et al. Sonographic Findings of Hands and Wrists in Systemic Lupus Erythematosus Patients With Jaccoud Arthropathy. *J Clin Rheumatol.* 2018; 24(2): 70-4.
67. Namjou B, Ni Y, Harley IT, Chepelev I, Cobb B, Kottyan LC, et al. The effect of inversion at 8p23 on BLK association with lupus in Caucasian population. *PloS one.* 2014; 9(12): e115614.
68. Bernal-Quiros M, Wu YY, Alarcon-Riquelme ME, Castillejo-Lopez C. BANK1 and BLK act through phospholipase C gamma 2 in B-cell signaling. *PloS one.* 2013; 8(3): e59842.
69. Bolin K, Sandling JK, Zickert A, Jonsen A, Sjowall C, Svenungsson E, et al. Association of STAT4 polymorphism with severe renal insufficiency in lupus nephritis. *PloS one.* 2013; 8(12): e84450.
70. Li P, Cao C, Luan H, Li C, Hu C, Zhang S, et al. Association of genetic variations in the STAT4 and IRF7/KIAA1542 regions with systemic lupus erythematosus in a Northern Han Chinese population. *Hum Immunol.* 2011; 72(3): 249-55.
71. Lu Q. The critical importance of epigenetics in autoimmunity. *J Autoimmun.* 2013; 41: 1-5.
72. Odhams CA, Cortini A, Chen L, Roberts AL, Vinuela A, Buil A, et al. Mapping eQTLs with RNA-seq reveals novel susceptibility genes, non-coding RNAs and alternative-splicing events in systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet.* 2017; 26(5): 1003-17.
73. Molineros JE, Yang W, Zhou XJ, Sun C, Okada Y, Zhang H, et al. Confirmation of five novel susceptibility loci for systemic lupus erythematosus (SLE) and integrated network analysis of 82 SLE susceptibility loci. *Hum Mol Genet.* 2017; 26(6): 1205-16.

74. Zhu H, Mi W, Luo H, Chen T, Liu S, Raman I, et al. Whole-genome transcription and DNA methylation analysis of peripheral blood mononuclear cells identified aberrant gene regulation pathways in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2016; 18: 162.
75. Teruel M, Sawalha AH. Epigenetic Variability in Systemic Lupus Erythematosus: What We Learned from Genome-Wide DNA Methylation Studies. *Curr Rheumatol Rep.* 2017; 19(6): 32.

APÊNDICE

APÊNDICE A FICHA DO PACIENTE

Nome:
 Matrícula:
 Jaccoud:
 Raça:
 Data de diagnóstico LES:
 Tempo de artrite:
 Critérios:
 lúpus discoide:
 fotossensibilidade:
 rash malar:
 úlceras orais:
 serosite: (pericardite: pleurite:)
 hematológico: (leucopenia, linfopenia, plaquetopenia, anemia hemolítica)
 renal: (proteinúria > 500, cilindrúria, disfunção renal/diálise)
 valor de proteinúria: cr:
 FAN:
 Anti DNA:
 Anti Sm:
 Anti Ro:
 Anti La:
 Anti RNP:
 Anticoagulante lúpico (LAC):
 Anticardiolipina: IgA IgM IgG
 Anti beta-2-glico: IgA IgM IgG
 Neurológico (psicose ou convulsão):
 FR:
 Anti CCP:
 Observações

ANEXOS

ANEXO A Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de Pesquisa: Estudo do HLA da classe II e polimorfismos genéticos em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico com ou sem Artropatia de Jaccoud

Eu....., fui convidado (a) a participar da pesquisa acima citada sob a coordenação do Dr Mittermayer Barreto Santiago. O objetivo principal desta pesquisa é avaliar a participação genética de pacientes com Lúpus e Artropatia de Jaccoud. Fui informado que essa doença provoca deformidades nas articulações, principalmente mãos e punhos. Nessa avaliação, serei submetido a uma avaliação clínica, que inclui anamnese e exame físico (da mesma forma que ocorre nas consultas médicas da reumatologia), nas quais o médico faz uma entrevista sobre a doença, sintomas e examina o paciente (verifica a pressão, examina as articulações e outros segmentos como pulmão, coração e abdome). Essa consulta será realizada por um reumatologista do Ambulatório Docente e Assistencial de Brotas (ADAB). Além disso, farei exames de sangue. Esses exames serão necessários para fazer a análise genética para analisar as características dos pacientes e avaliar o risco de desenvolver Artropatia de Jaccoud, ajudando no melhor acompanhamento da doença. Esse exame não é realizado rotineiramente.

A participação nesta pesquisa não traz riscos ou complicações, pois os procedimentos empregados são os de rotina. Assim, a pesquisa obedece aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Meu nome não será revelado em nenhum momento. Somente a equipe de pesquisadores terá conhecimento dos dados.

Os resultados e esclarecimentos sobre os exames também estarão à minha disposição.

Ficou claro para mim que caso eu não concorde em participar voluntariamente da pesquisa não terei qualquer prejuízo, e caso participe, o resultado da pesquisa poderá ser divulgado, desde que meu nome não seja identificado.

Fui informado que caso eu necessite de esclarecimentos adicionais eu deverei procurar o Dr. Mittermayer Santiago no Serviço de Reumatologia do Ambulatório Docente e Assistencial de Brotas (ADAB), pessoalmente, às segundas-feiras das 16:00 às 19:00, ou pelos telefones do ADAB (71) 32349350, ou pelo celular (71) 988355001. Também posso procurar Dra. Anna Paula Mota Duque, pelo telefone (71) 988282411, caso eu precise de alguma explicação ou deseje fazer alguma sugestão ou reclamação.

Estou ciente que caso tenha dúvidas e/ou denúncias a fazer, também poderei procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública que funciona na Rua Dom João VI, n 275, em Brotas, na cidade de Salvador, tel. – (71) 3276-8225, ou o Conselho Regional de Medicina (CREMEB), localizado à R. Guadalajara n 15, Ondina, tel. –3339-2800.

Estou ciente que este documento está escrito em duas vias e uma delas ficará comigo (participante da pesquisa). Todas as duas vias serão assinadas por mim e pelo pesquisador.

Assim, concordo em participar voluntariamente desse estudo.

Salvador, ____ / ____ / 2017

Participante da pesquisa:

Nome _____

Assinatura _____

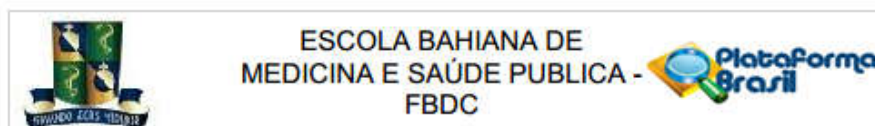


Responsável pela pesquisa:

Nome _____

Assinatura _____

ANEXO B Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética Em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do HLA da classe II e polimorfismos genéticos em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico com ou sem Artropatia de Jaccoud

Pesquisador: Mittermayer Barreto Santiago

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 61808816.0.0000.5544

Instituição Proponente: Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.947.354

Apresentação do Projeto:

A artropatia de Jaccoud (AJ) é uma artropatia deformante não-erosiva que foi inicialmente descrita em portadores de febre reumática (FR). Posteriormente, a AJ foi relatada em pacientes com outras doenças do tecido conjuntivo, principalmente lúpus eritematoso sistêmico (LES), com uma prevalência em torno de 5%. A doença pode causar deformidades articulares, passíveis de correção com a movimentação passiva, semelhantes a artrite reumatóide, levando a impacto na realização de atividades básicas da vida diária e qualidade de vida dos pacientes. Sua fisiopatologia ainda não é esclarecida, nem há estudos de base genética descritos nessa população de doentes.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar o perfil do HLA da classe II, as frequências e/ou variações dos polimorfismos rs13277113, rs2187668, rs10488631 e rs7574865 em uma amostra de pacientes brasileiros com Lúpus Eritematoso Sistêmico, comparando a sua distribuição naqueles com ou sem Artropatia de Jaccoud.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

Os procedimentos empregados são os de rotina (exames laboratoriais de sangue e urina), levando apenas ao possível desconforto da punção com agulha para a coleta do sangue. Para minimizar

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, 275
Bairro: BROTAS CEP: 40.290-000
UF: BA Município: SALVADOR E-mail: cep@bahiana.edu.br
Telefone: (71)3276-8225



Continuação do Parecer: 1.947.354

esse desconforto, a coleta será realizada por profissional treinado. É necessário que alguns pacientes se desloquem para o laboratório para coleta de exames. De preferência, solicitamos coleta de exames laboratoriais no mesmo dia da consulta, a fim de evitar deslocamentos adicionais e maiores gastos com o transporte dos pacientes. A pesquisa obedece aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Benefícios

Os benefícios diretos aos pacientes são a realização da genotipagem para avaliar fatores de risco genéticos de desenvolver Artropatia e Jaccoud. Esses exames não são disponíveis nos serviços de saúde. Isso possibilitará um melhor acompanhamento e tratamento precoce da doença. A partir de estudos como esse, de genética e etiopatogênese, existe também a possibilidade de criação de novas drogas, sintéticas ou biológicas, para o tratamento da Artropatia de Jaccoud.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo tipo caso-controle, no qual será feito o levantamento dos perfis genéticos e sua análise comparativa nos grupos definidos de pacientes com Lúpus eritematoso sistêmico (LES), com ou sem artropatia de Jaccoud (AJ), e de pacientes saudáveis. Serão selecionados pacientes com diagnóstico de LES, acompanhados no ambulatório de Reumatologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), em Salvador. Para compor o grupo de indivíduos sem LES, serão selecionadas, aleatoriamente, 200 amostras de indivíduos anônimos não-vinculados, provenientes da cidade de Salvador, Bahia, através do projeto Social Changes, Asthma and Allergy in Latin America (SCAALA), em curso, que avalia genotipagem de SNPs numa população de crianças com sibilos, asma e alergias. Os primeiros inquéritos relacionados foram aplicados em 2005, quando as crianças tinham entre 5 e 12 anos de idade. A genotipagem dos SNPs foi realizada na plataforma Illumina Human de onde extraiu-se os 4 SNPs relacionados com o desenvolvimento de Lupus Eritematoso Sistêmico para realização da pesquisa. No grupo de pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico, serão avaliados os dados sócio-demográficos e manifestações clínicas da doença observados naqueles com ou sem Artropatia de Jaccoud. Tais dados serão obtidos por avaliação clínica presencial assim como revisão de dados de prontuário. Para análise laboratorial da tipagem do HLA da classe II (DR e DQ), as amostras de DNA dos pacientes serão extraídas a partir de células mononucleares do sangue periférico e separadas após a coleta de 10 ml sangue total com tubo sem anticoagulante. O equipamento Luminex da biometrix, disponível no laboratório de

Imunogenética da Universidade Estadual de Campinas, para onde serão

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, 275	CEP: 40.290-000
Bairro: BROTAS	
UF: BA	Município: SALVADOR
Telefone: (71)3276-8225	E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 1.947.354

encaminhadas as amostras de DNA, de forma supervisionada e em condições adequadas de armazenamento. Cerca de 10 ml de sangue serão coletados de cada paciente. Após centrifugação, alíquotas de soro serão armazenadas em freezer a -20°C até o seu uso. Esse procedimento ocorrerá no Laboratório Avançado de Reumatologia (LAR), pertencente ao Serviço de Reumatologia do Hospital Santa Izabel/EBMSP. O equipamento encontra-se no Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), da Fiocruz, em Salvador.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto: devidamente preenchida e com assinatura do responsável institucional;

Cronograma: discrimina as fases da pesquisa;

Orçamento: apresentado informando a fonte financiadora;

TCLE: adequado;

Carta de anuência: anexadas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A análise bioética deste projeto para verificação de resposta às pendências assinaladas anteriormente, identificou que os pesquisadores atenderam fielmente às solicitações de acordo com o descritivo abaixo, estando o projeto passível de execução imediata.

1-Cronograma:

1-1-Incluídas as etapas de relatórios parciais ou final de acordo com a Res. 466/12 do CNS;

1-2-Ajustado cronograma para resolução de pendências;

2-Orçamento:

2-1-Previsto custo com transporte e alimentação ao participante da pesquisa;

2-2- Esclarecida a fonte financiadora do projeto ;

3-TCLE:

3-1-Descritos no TCLE quais exames clínicos o participante será submetido;

3-2-Descritos os benefícios diretos aos participantes da pesquisa;

3-3 Descrita a forma de sanar os riscos da pesquisa;

3-4-Indicados os contatos do CEP, endereço e telefone para caso de dúvida ou denúncia;

3-5-Informado que o TCLE é escrito em duas vias de igual teor e que uma ficará com o participante da pesquisa e que todas as vias serão rubricadas pelo participante e pesquisador.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

Bairro: BROTAS

CEP: 40.290-000

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3276-8225

E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 1.947.354

Atenção : o não cumprimento à Res. 466/12 do CNS abaixo transcrita implicará na impossibilidade de avaliação de novos projetos deste pesquisador.

XI DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador: a) e b) (...)

c) desenvolver o projeto conforme delineado;

d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;

e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;

f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;

g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e

h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_806726.pdf	21/12/2016 02:26:28		Aceito
Outros	RESPOSTA_DE_PENDENCIAS.docx	21/12/2016 02:25:57	ANNA PAULA MOTA DUQUE SOUSA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Jaccoud_Final.doc	21/12/2016 02:16:31	ANNA PAULA MOTA DUQUE SOUSA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	21/12/2016 02:16:11	ANNA PAULA MOTA DUQUE SOUSA	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTOpdf.pdf	02/11/2016 12:45:53	ANNA PAULA MOTA DUQUE SOUSA	Aceito
Outros	carta_anuencia_fiocruz.pdf	02/11/2016 12:40:37	ANNA PAULA MOTA DUQUE SOUSA	Aceito
Outros	anapaula.pdf	19/10/2016 23:30:28	ANNA PAULA MOTA DUQUE SOUSA	Aceito
Outros	cartaanuenciaanna.pdf	19/10/2016 23:29:42	ANNA PAULA MOTA DUQUE SOUSA	Aceito

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

Bairro: BROTAS

CEP: 40.290-000

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3276-8225

E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 1.947.354

Situação do Parecer:

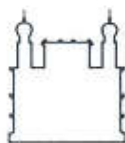
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 03 de Março de 2017

Assinado por:
Roseny Ferreira
(Coordenador)

ANEXO C Carta de Aprovação do Projeto Epigen-Brasil

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Comitê de Ética

**CARTA DE APROVAÇÃO Nº 03/2010 – CEP / CPqRR****Protocolo CEP - CPqRR nº: 02/2010**

Projeto de Pesquisa: "EPIDEMIOLOGIA GENÔMICA DE DOENÇAS COMPLEXAS EM COORTES BRASILEIRAS DE BASE POPULACIONAL (PROJETO EPIGEN-BRASIL)". GI - Genética Humana, Pesquisa com Cooperação Estrangeira.

Pesquisador Responsável: MARIA FERNANDA FURTADO DE LIMA E COSTA

Instituição: Centro de Pesquisa René Rachou

CAAE: 0003.1.245.000-10

Ao se proceder à análise o protocolo em questão, constatou-se que o estudo atende aos aspectos fundamentais da Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisa René Rachou / FIOCRUZ, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96 CNS / CONEP, manifesta-se pela homologação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: PROJETO APROVADO.

Firma-se diante deste documento a necessidade de serem apresentados os relatórios:

- Parcial 01: Abril 2011;
- Parcial 02: Abril 2012;
- Final: Abril 2013.

Bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2010.



João Carlos Pinto Dias
 Coordenador do CEP/SH-CPqRR
 Dr. João Carlos Pinto Dias
 COORDENADOR
 COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO D Manuscrito submetido à publicação

International Journal of Rheumatic Diseases

International Journal of
Rheumatic Diseases



**Profile of genetic polymorphisms in patients with Systemic
Lupus Erythematosus with and without Jaccoud Arthropathy**

Journal:	<i>International Journal of Rheumatic Diseases</i>
Manuscript ID	IJR-2018-0532
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	13-Oct-2018
Complete List of Authors:	Sousa, Anna Paula Sousa, Giselle; Fundação Oswaldo Cruz, Bahia, BR Costa, Gustavo; Universidade Federal da Bahia Barbosa, Lúcio; Fundação Oswaldo Cruz, Bahia, BR Grassi, Maria ; Fundacao Oswaldo Cruz Monteiro, Maria Eduarda; Universidade Federal da Bahia Barreto, Mauricio; Fundação Oswaldo Cruz Pedreira, Ana Luiza; Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública Machicado, viviane ; Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública da Fonseca, Emanuela ; Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública RIBEIRO, DANIEL; HOSPITAL SANTA IZABEL, Lins, Carolina; Pós graduação; Santos, Willer; Escola Bahiana de Medicina e Saude Publica Silva, Carla Rosa, Genevieve; Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública Galvão, Verena; Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública Reis, Mittermayer; Fundacao Oswaldo Cruz Reis, Eliana; Fundacao Oswaldo Cruz Santiago, Mittermayer ; Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública,
Keywords:	Systemic Lupus Erythematosus, Jaccoud Arthropathy, genetic polymorphisms



International Journal of Rheumatic Diseases

Profile of genetic polymorphisms in patients with Systemic Lupus Erythematosus with and without Jaccoud Arthropathy

Polymorphisms in Systemic Lupus Erythematosus

Anna Paula Mota Duque Sousa^{1,2}, Giselle Calasans de Souza Costa³, Gustavo Nunes de Oliveira Costa⁴, Lúcio Macedo Barbosa³, Maria Fernanda Grassi³, Maria Eduarda Haerdy Monteiro⁴, Eliana Almeida Gomes Reis³, Mittermayer Galvão dos Reis³, Maurício Lima Barreto⁴, Ana Luisa Pedreira¹, Daniel Sá Ribeiro¹, Carolina Freitas Lins¹, Verena Galvão¹, Willer Gonçalves Dourado Santos¹, Genevieve Rosa¹, Viviane Machicado¹, Emanuela Pimenta da Fonseca¹, Carla Baleeiro Rodrigues Silva¹, Mittermayer Barreto Santiago^{1,2,5}

- ¹Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública
- ²Serviço de Reumatologia Professor Albino Novais do Hospital Universitário Professor Edgard Santos - Universidade Federal da Bahia (UFBA) – Salvador, Brasil
- ³Fundação Gonçalo Muniz (Fiocruz) – Salvador, Brasil
- ⁴UFBA- Salvador, Brasil
- ⁵Serviços Especializados em Reumatologia (SER) da Bahia, Salvador, Brasil

Correspondence: Mittermayer B. Santiago. Serviços Especializados em Reumatologia (SER) da Bahia. Rua Conde Filho, 117, Graça, Salvador, Bahia, Brazil. CEP 40150150. Phone 71-30229886. mbsantiago2014@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: Genes like *HLA*, *STAT4*, *IRF5* and *BLK* induce autoimmunity by activation of B and T cells and induction of interferon production. These genes have been associated with systemic lupus erythematosus (SLE) in European, Asian and non-Brazilian Amerindian populations. The aim of this study was to evaluate an association between these genes and the predisposition for SLE in Brazilian

patients as well as their relationship with Jaccoud arthropathy (JA) and other clinical and laboratory features of SLE. **Methods:** Patients (n=144) diagnosed with SLE from Brazil were included in the present study. Thirty-eight of them had JA. A group of healthy individuals (n=614) was included as control. All participants were genotyped for rs9271100, rs7574865, rs10488631 and rs13277113 polymorphisms in the *HLA*, *STAT4*, *IRF5* and *BLK* genes, respectively, by real-time PCR. The allele and genotypic frequencies were correlated with the presence of SLE, JA and other manifestations of the disease, adjusted for sex and/or age, in multivariate analysis. **Results:** The T allele, TT and GT genotypes of rs7574865 in *STAT4* and C allele, CC and CT genotypes of rs10488631 in *IRF5* presented higher frequencies in the SLE population as compared to the controls. There were no associations between any of the polymorphisms evaluated and SLE manifestations, but the A allele, AA and AG genotypes of rs13277113 in *BLK* showed an association with the presence of JA. **Conclusions:** The polymorphisms in *STAT4* (rs7574865) and *IRF5* (rs10488631) are associated with SLE, as already observed in other populations. The polymorphism rs13277113 in *BLK* was found to be a possible genetic risk for JA.

Key-words: Systemic Lupus Erythematosus; Jaccoud Arthropathy; genetic polymorphisms.

INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an inflammatory and autoimmune disease, affecting mainly female population in reproductive age (1). The disease has a large spectrum of manifestations, varying from mucocutaneous or osteoarticular findings to serious organ involvement. Approximately 5% of patients with SLE develop a non-erosive non-fixed degenerative arthropathy, denominated as Jaccoud arthropathy (JA) (2, 3).

It is presumed that environmental factors like ultra-violet (UV) radiation can induce modifications to the innate and adaptive immune response, provoking or accelerating the development of SLE in genetically susceptible individuals (4, 5). Family association and Genome Wide Association Studies (GWAS) identified approximately

80 susceptibility *loci* for SLE. These contain inherited polymorphic mutations denominated as single nucleotide polymorphisms (SNPs) (6). The strongest genetic associations of SLE come from human leukocyte antigen (HLA) system, mainly the alleles HLA DRB1*1501 (HLA-DR2) and HLA DRB1*0301 (HLA-DR3) (7, 8). Moreover, other genes also have been highly related to the development of SLE, such as *STAT4* (Signal Transducer and Activator of Transcriptor 4), *IRF5* (Interferon Regulatory Factor 5), *ITGAM* (Integrin Alpha M) and *BLK* (B Lymphoid Kinase), among others (7-11). The relationship of these genes with SLE was established in European populations and, later confirmed through GWAS in Asian, European and non-Brazilian Amerindian populations (12, 13).

The SNPs present in these genes can alter the structure, function or expression of the proteins encoded by these genes, which can ultimately affect the function of B and T cells and the production of interferon. Alterations in cell signaling, clearance of cellular debris, DNA repair, apoptosis, activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B), can generate an imbalance in immune response and favor the development of autoimmunity (5, 6).

Besides the genetic susceptibility for SLE, several studies tried to investigate if genes could also be involved in specific manifestations of the disease, such as nephritis, discoid rash, arthritis, anti-DNA antibodies, etc. Nevertheless, the results were controversial in different populations (9, 14). Only a small study performed in Japan explored the genetic aspect of JA and demonstrated the presence of HLA A 11 and B 61 in 5 out 9 patients with JA (15).

The objective of the present study was to evaluate the existence of a genetic association between the polymorphisms (rs9271100 in *HLA*, rs7574865 in *STAT4*, rs10488631 in *IRF5* and rs13277113 in *BLK*) and the presence of SLE as well as

with some manifestations of the disease, particularly JA in a sample of Brazilian population.

MATERIAL

AND

METHODS

Patients

A total of 144 SLE patients diagnosed on the basis of the American College of Rheumatology criteria were included in this study (16). Among them, 38 had JA, according to criteria proposed by Santiago (17). They were selected from two referral services of rheumatology, in Salvador, Brazil. A group of 614 gender matched healthy individuals were included as controls (proportion of 4:1 in relation to SLE). In the SLE group, clinical evaluation and chart review was performed in all patients.

All the participants who accepted to participate in the study signed the informed consent form. The project was approved by the ethics research committee of the Escola Bahiana de Medicina e Saúde Publica.

Laboratory investigations

Besides searching for autoantibodies and routine laboratory tests, specific genetic studies were performed as follows:

Genotyping

The genomic DNA of mononucleated cells of peripheral blood was extracted using a Qiagen DNA Blood Mini kit (Valencia - CA). The SNPs: rs9271100 found in *HLA*, rs7574865 in *STAT4*, rs10488631 in *IRF5* and rs13277113 in *BLK*, were genotyped by Real Time PCR by using "Taq Man SNP Genotyping Assay" kit from Applied Biosystem (Foster City, CA), containing specific probes for high and low frequency alleles. The manufacturer's instructions were followed strictly.

Statistical Analysis

Statistical Package for the Social Science (SPSS Chicago – IL, version 21) was used for the descriptive and comparative evaluation of the demographic, clinical and laboratory data of the patients with SLE. The frequencies were expressed in proportions or mean \pm standard deviation. Chi-square, exact Fisher or Student's T tests were used for the comparison of different parameters.

The allelic and genotypic frequencies of the patients and controls were calculated, using the Plink program (Purcell, S; New York - NY, version 1.9, 2017). The associations between allelic and genotypic frequencies and the outcomes (SLE, JA, clinical and laboratory manifestations of SLE) were tested by Odds Ratio (OR) calculation, exact Fisher or Armitage Tests by Stata 14 or Plink program. Models of allelic and additive inheritance were used. The multivariate analysis by logistic regression of the genotypes and alleles was performed according to sex and/or age. Values ≤ 0.05 were considered as statistically significant.

RESULTS

Ninety eight percent of individuals with SLE and control were females ($p=1.0$) and the mean age was 45 ± 10 and 15 ± 2 years, respectively ($p=0.01$).

In the patients with SLE the mean duration of the disease was 12 ± 5 years. Those with JA had higher disease duration when compared to those without JA (13 ± 5 and 10 ± 5 years, respectively, $p=0.004$). The main clinical and laboratory findings observed in the SLE patients with or without JA are presented in table 01.

The allelic and genotypic frequencies observed in the entire population are presented in table 02. In SLE patients, significantly higher frequencies of the T allele of rs7574865 in gene *STAT4* ($p<0.001$) and C allele of rs10488631 in gene *IRF5* ($p=0.02$) were observed as compared to controls. Moreover, individuals who had 2 T alleles for *STAT4* showed three times more chance of developing SLE than the ones

those didn't have this T allele. According to the model of additive inheritance, the TT and GT genotypes of rs7574865 in gene *STAT4* and the CC and CT genotype of rs10488631 in gene *IRF5* were also more frequent in the SLE population as compared to the controls. The frequencies of the other polymorphisms analyzed in the present study did not present differences among the groups.

In comparative analysis of the patient subgroups with or without JA, a larger frequency (34.7%) of the A allele and AA and AG genotypes of rs1327713 in *BLK* was observed in the population with JA, after multivariate analysis, adjusted for gender and age (OR = 2.00, 95% CI, 1.05-3.74, p = 0.01) (Table 03).

The clinical manifestations and autoantibodies of SLE were compared with the genotypes of *STAT4*, *IRF5*, *HLA* and *BLK*, however no significant association was observed among them.

DISCUSSION

The contribution of genetic factors for the development of SLE has frequently been addressed in the literature. The expression of the disease results due to the interaction of genetic, environmental and epigenetic factors (18). Several genes have been associated with the development of SLE. The present study demonstrated an association of the T allele of rs7574865 and the C allele of rs10488631, in the genes *STAT4* and *IRF5*, respectively, with SLE in a sample of Brazilian patients. Moreover, the A allele of rs7574865 polymorphism in *BLK* gene presented an association with the development of JA in the study population.

The association of SNPs in gene *STAT4* and the development of SLE have already been established. Protein *STAT4* is necessary for the inflammatory response triggered by interleukins (ILs). It is mainly expressed in cytoplasm of T and natural killer cells, after activation of IL-12 receptor, and it is phosphorylated and activated by

janus kinase 2 (JAK2) and by tyrosine kinase 2 (TYK2). Subsequently, it moves to the nucleus, where it induces the expression of pro-inflammatory cytokines such as interferon γ (IFN- γ), promoting Th1 and Th17 response (18-20). Hagber et al. recently demonstrated that T cells from patients with SLE carrying T allele from rs7574865 in gene *STAT4* exhibit an increased response to IL-12 and to IFN- α . Besides that, the study also suggested that the treatment with JAK inhibitors could be beneficial in that group of patients, because it inhibited the cellular activation of IL-12 *in vitro*. Therefore, future molecular therapeutic targets can be guided by the patient's genetic profile (20). Our findings of a statistically significant increase of T allele frequency from the SNP rs7574865 in gene *STAT4* in the patients with SLE when compared to individuals without SLE could suggest that the presence of this allele would be related to the development of SLE, through the increased response of T lymphocytes to the IL-12 and to IFN- α . However, further studies substantiated with functional studies in larger populations should be done.

Polymorphisms in *IRF5* gene present the strongest genetic association with the development SLE outside the region of HLA, mainly in North and South Americans (8, 12). When incubated with serum rich in immunocomplexes, dendritic cells of patients with SLE produced IFN- α , mainly in those cells from patients with haplotype of *IRF5* (rs2004640, rs10954213, rs10488631) (21). *IRF5* also presents a possible epistatic interaction with *STAT4*, leading to susceptibility of autoimmune diseases associated to IFN type I, such as SLE and rheumatoid arthritis (22). *IRFs* are also implicated in the pathogenesis of other autoimmune diseases, such as multiple sclerosis, Sjogren syndrome, systemic sclerosis, and intestinal inflammatory disease (7, 8, 18, 23-25). In the present study, the C allele of rs10488631 present in gene *IRF5* showed an association with the development of SLE. Thus, it is possible that

rs10488631 can participate, not separately, but in association with other polymorphisms, in the development of SLE through the increased production of IFN- α in dendritic cells.

Thus, due to the importance of IFN in the pathogenesis of SLE, clinical studies have evaluated new drugs that use IFN as a target. It is still necessary to analyze the risk-benefit of long-term treatment and which patients are eligible for anti-IFN treatment. It seems that the effect of these drugs is influenced by the patient's IFN- α signature, which is being evaluated as a possible biomarker for patients that are more likely to respond to anti-IFN treatment (26, 27).

Although HLA polymorphisms represent the strongest genetic association with SLE, there was no association observed for rs9271100 in *HLA* and SLE in the present study. A possible explanation is that the frequencies of its polymorphisms vary according to the population's ancestry (7, 8, 12). The striking characteristic of *HLA* trans-ancestry was demonstrated in a meta-analysis with more than 35.000 Asian and European patients and in studies in Amerindians (12, 13). Other HLA polymorphisms which can be associated to SLE were not evaluated in the present study.

Literature reveals heterogeneous results on the association of genes of *HLA*, *STAT4*, *IRF5* and *BLK* with manifestations of SLE. Some SNPs in *STAT4* were associated with the presence of lupus nephritis, severe SLE and the presence of anti-DNA and anti-Sm antibodies (7, 8, 14, 20, 28, 29). SNPs of *IRF5* were associated to lupus nephritis, cutaneous manifestations and autoantibodies as anti-DNA, anti-Ro and anti-La (5, 14). *BLK* and its variants were also associated with lupus nephritis (9). These results suggest that the genes have a role in the prognosis and evaluation of

patients with SLE, but it is questioned by some authors due to the low level of replication of the studies in populations of different ancestry (8). We found a possible genetic association between JA and rs1327713 in the *BLK* gene. *BLK* codes for a non-tyrosine kinase receptor from the Scr family, which is involved in the signaling, development and differentiation of B lymphocytes (30). SNP rs1327713 is found in an area located between *BLK* and *C8orf1* genes. SNP and its variants significantly reduce the expression of *BLK*, increasing the risk of developing SLE (7). It is postulated that the altered levels of *BLK* protein can influence the tolerance mechanisms of B lymphocytes, and possibly of T cells, Th-17 cells as well as plasmacytoid dendritic cells. No other study tested its frequency in patients with JA. The possible association of *BLK* and JA can bring questions on the role of B cells and their performance in the pathogenesis of the disease. Previous studies also suggested that there can be a participation of Interleukin-6 (IL-6) in the development of JA (3, 31). Wallace et al. suggested that in patients with SLE, IL-6 is involved in the hyperactivity of B cells and autoantibodies production, influencing the differentiation of Th17 cells and acute phase proteins, and increasing the inflammatory response (32). However, the performance of those molecules and their interaction with possible risk genes is still completely unknown in SLE and JA.

It is important to highlight that many genes may not have a direct causal link when analyzed on their own. It is necessary to understand the functional, structural and regulatory consequences that SNPs can raise in an intracellular medium as well as its possible interactions with environmental factors (33-35). The epigenetic phenomena such as the methylation process can be influenced or induced by environmental phenomena like UV radiation, inducing lupus (18, 36). Regulatory Interferon genes are frequently demethylated and these alterations precede genetic

transcription. Those mechanisms, currently thoroughly studied, represent an important link between genetic and environmental factors. These epigenetic effects influence the expression and function of the genes involved in SLE, showing that this interaction is much more complex than it appears to be (36-39).

Acknowledgements

Santiago, M.B., Grassi, M.F. and Reis, M. are currently receiving a scholarship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Disclosure statement

The authors have declared no conflicts of interest that are directly relevant to the content of this manuscript.

REFERENCES

1. Costi LR, Iwamoto HM, Neves DCO, Caldas CAM. Mortality from systemic erythematosus lupus in Brazil: evaluation of causes according to the government health database. *Rev Bras Rheumatol Engl Ed.* 2017; 57(6): 574-82.
2. Santiago MB, Galvao V. Jaccoud arthropathy in systemic lupus erythematosus: analysis of clinical characteristics and review of the literature. *Medicine.* 2008; 87(1): 37-44.
3. Kolasinski SL, Chi AS, Lopez-Garib AJ. Current Perspectives on Imaging for Systemic Lupus Erythematosus, Systemic Sclerosis, and Dermatomyositis/Polymyositis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2016; 42(4): 711-32.
4. Kuo CF, Grainge MJ, Valdes AM, See LC, Luo SF, Yu KH, et al. Familial Aggregation of Systemic Lupus Erythematosus and Coaggregation of Autoimmune Diseases in Affected Families. *JAMA Intern Med.* 2015; 175(9): 1518-26.

5. Silva JdA, Addobbati C, Sandrin-Garcia P, Crovella S. Systemic Lupus Erythematosus: Old and New Susceptibility Genes versus Clinical Manifestations. *Curr Genomics*. 2014; 15(1): 52-65.
6. Chen L, Morris DL, Vyse TJ. Genetic advances in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol*. 2017; 29(5): 423-33.
7. Hom G, Graham RR, Modrek B, Taylor KE, Ortmann W, Garnier S, et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med*. 2008; 358(9): 900-9.
8. Teruel M, Alarcon-Riquelme ME. The genetic basis of systemic lupus erythematosus: What are the risk factors and what have we learned. *J Autoimmun*. 2016; 74: 161-75.
9. Ruiz-Larranaga O, Migliorini P, Uribarri M, Czirjak L, Alcaro MC, Del Amo J, et al. Genetic association study of systemic lupus erythematosus and disease subphenotypes in European populations. *Clin Rheumatol*. 2016; 35(5): 1161-8.
10. International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus G, Harley JB, Alarcon-Riquelme ME, Criswell LA, Jacob CO, Kimberly RP, et al. Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet*. 2008; 40(2): 204-10.
11. Graham RR, Cotsapas C, Davies L, Hackett R, Lessard CJ, Leon JM, et al. Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2008; 40(9): 1059-61.
12. Alarcon-Riquelme ME, Ziegler JT, Molineros J, Howard TD, Moreno-Estrada A, Sanchez-Rodriguez E, et al. Genome-Wide Association Study in an Amerindian

Ancestry Population Reveals Novel Systemic Lupus Erythematosus Risk Loci and the Role of European Admixture. *Arthritis Rheumatol.* 2016; 68(4): 932-43.

13. Morris DL, Sheng Y, Zhang Y, Wang YF, Zhu Z, Tomblason P, et al. Genome-wide association meta-analysis in Chinese and European individuals identifies ten new loci associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2016; 48(8): 940-6.

14. Ceccarelli F, Perricone C, Borgiani P, Ciccacci C, Rufini S, Cipriano E, et al. Genetic Factors in Systemic Lupus Erythematosus: Contribution to Disease Phenotype. *J Immunol Res.* 2015; 2015: 745647.

15. Takeishi M, Mimori A, Suzuki T. Clinical and immunological features of systemic lupus erythematosus complicated by Jaccoud's arthropathy. *Mod Rheumatol.* 2001; 11(1): 47-51.

16. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982; 25(11): 1271-7.

17. Santiago MB. Jaccoud's arthropathy: proper classification criteria and treatment are still needed. *Rheumatol Int.* 2013; 33(11): 2953-4.

18. Ghodke-Puranik Y, Niewold TB. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2015; 64: 125-36.

19. Beltran Ramirez O, Mendoza Rincon JF, Barbosa Cobos RE, Aleman Avila I, Ramirez Bello J. STAT4 confers risk for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Mexican patients. *Immunol Lett.* 2016; 175: 40-3.

20. Hagberg N, Joelsson M, Leonard D, Reid S, Eloranta ML, Mo J, et al. The STAT4 SLE risk allele rs7574865[T] is associated with increased IL-12-induced IFN-

- gamma production in T cells from patients with SLE. *Ann Rheum Dis.* 2018. 24(2): 582-96.
21. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, et al. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(4): 1065-75.
 22. Kim K, Cho SK, Han TU, Kim JH, Kang SJ, Kang C, et al. A redundant epistatic interaction between IRF5 and STAT4 of the type I interferon pathway in susceptibility to lupus and rheumatoid arthritis. *Lupus.* 2013; 22(13): 1336-40.
 23. Sigurdsson S, Nordmark G, Goring HH, Lindroos K, Wiman AC, Sturfelt G, et al. Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet.* 2005; 76(3): 528-37.
 24. Kottyan LC, Zoller EE, Bene J, Lu X, Kelly JA, Rupert AM, et al. The IRF5-TNPO3 association with systemic lupus erythematosus has two components that other autoimmune disorders variably share. *Hum Mol Genet.* 2015; 24(2): 582-96.
 25. Tang L, Chen B, Ma B, Nie S. Association between IRF5 polymorphisms and autoimmune diseases: a meta-analysis. *Genet Mol Res.* 2014; 13(2): 4473-85.
 26. Kalunian KC. Interferon-targeted therapy in systemic lupus erythematosus: Is this an alternative to targeting B and T cells? *Lupus.* 2016; 25(10): 1097-101.
 27. Massarotti EM, Allore HG, Costenbader K. Editorial: Interferon-Targeted Therapy for Systemic Lupus Erythematosus: Are the Trials on Target? *Arthritis Rheumatol.* 2017; 69(2): 245-8.
 28. Taylor KE, Remmers EF, Lee AT, Ortmann WA, Plenge RM, Tian C, et al. Specificity of the STAT4 genetic association for severe disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet.* 2008; 4(5): e1000084.

29. Bolin K, Sandling JK, Zickert A, Jonsen A, Sjowall C, Svenungsson E, et al. Association of STAT4 polymorphism with severe renal insufficiency in lupus nephritis. *PloS one*. 2013; 8(12): e84450.
30. Namjou B, Ni Y, Harley IT, Chepelev I, Cobb B, Kottyan LC, et al. The effect of inversion at 8p23 on BLK association with lupus in Caucasian population. *PloS one*. 2014; 9(12): e115614.
31. Atta AM, Oliveira RC, Oliveira IS, Menezes MP, Santos TP, Sousa Atta ML, et al. Higher level of IL-6 in Jaccoud's arthropathy secondary to systemic lupus erythematosus: a perspective for its treatment? *Rheumatol Int*. 2015; 35(1): 167-70.
32. Wallace DJ, Strand V, Merrill JT, Popa S, Spindler AJ, Eimon A, et al. Efficacy and safety of an interleukin 6 monoclonal antibody for the treatment of systemic lupus erythematosus: a phase II dose-ranging randomised controlled trial. *Ann Rheum Dis*. 2017; 76(3): 534-42.
33. Lu Q. The critical importance of epigenetics in autoimmunity. *J Autoimmun*. 2013; 41: 1-5.
34. Odhams CA, Cortini A, Chen L, Roberts AL, Vinuela A, Buil A, et al. Mapping eQTLs with RNA-seq reveals novel susceptibility genes, non-coding RNAs and alternative-splicing events in systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet*. 2017; 26(5): 1003-17.
35. Molineros JE, Yang W, Zhou XJ, Sun C, Okada Y, Zhang H, et al. Confirmation of five novel susceptibility loci for systemic lupus erythematosus (SLE) and integrated network analysis of 82 SLE susceptibility loci. *Hum Mol Genet*. 2017; 26(6): 1205-16.

36. Sparks JA, Costenbader KH. Genetics, environment, and gene-environment interactions in the development of systemic rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am.* 2014; 40(4): 637-57.
37. Teruel M, Sawalha AH. Epigenetic Variability in Systemic Lupus Erythematosus: What We Learned from Genome-Wide DNA Methylation Studies. *Curr Rheumatol Rep.* 2017; 19(6): 32.
38. Kiyohara C, Washio M, Horiuchi T, Tada Y, Asami T, Ide S, et al. Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 polymorphisms and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Lupus.* 2009; 18(7): 630-8.
39. Fraser PA, Ding WZ, Mohseni M, Treadwell EL, Dooley MA, St Clair EW, et al. Glutathione S-transferase M null homozygosity and risk of systemic lupus erythematosus associated with sun exposure: a possible gene-environment interaction for autoimmunity. *J Rheumatol.* 2003; 30(2): 276-82.