



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

ALINE RIBEIRO BARROS

**POLIMORFISMO GENÉTICO DO IFNG E ASSOCIAÇÕES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO NO DISTRITO FEDERAL.**

BRASÍLIA, 2018

ALINE RIBEIRO BARROS

**POLIMORFISMO GENÉTICO DO IFNG E ASSOCIAÇÕES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO NO DISTRITO FEDERAL.**

Monografia de Conclusão de Curso
apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de
Farmacêutico, Faculdade de Ceilândia,
Universidade de Brasília.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Izabel Cristina
Rodrigues da Silva

BRASÍLIA, 2018

R B277p Ribeiro Barros, Aline
POLIMORFISMO GENÉTICO DO IFNG E ASSOCIAÇÕES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO NO DISTRITO FEDERAL. / Aline Ribeiro
Barros; orientador Izabel Cristina Rodrigues da Silva. --
Brasília, 2018.
52 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2018.

1. IFNG. 2. Polimorfismo. 3. LES. I. Cristina Rodrigues
da Silva, Izabel, orient. II. Título.

ALINE RIBEIRO BARROS

**POLIMORFISMO GENÉTICO DO IFNG E ASSOCIAÇÕES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO NO DISTRITO FEDERAL.**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(Universidade de Brasília - FCE)

Prof.^aDr.^aCalliandra Maria de Souza Silva
(Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Marciano Regis Rubini
(Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, 2018.

Dedico esse trabalho a todas as mulheres mães, que decidem se aventurar nesse universo machista e excludente que é o meio acadêmico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Noédla e Augusto, e a minha sogra, que me deram todo o apoio logístico e moral para conclusão da minha graduação.

Ao meu esposo Elias por não me fazer desistir diante dos entraves da vida.

À professora Izabel que além de ter desempenhado seu papel de professora com maestria também me mostrou o seu lado humano e acolhedor, sendo uma verdadeira mãe para mim durante toda a graduação.

Aos professores José Eduardo Pandóssio, Emília Vitória, Larissa, Paula, Lívia, Camila, Aline (Campus Darcy), Diego Madureira, Rodrigo, Edgar Bione e tantos outros que em algum momento da minha graduação deram palavras de incentivo, carinho e motivação, e me fizeram perceber que era sim possível concluir a graduação mesmo sendo mãe.

Aos professores Marciano e Calliandra que disponibilizaram seu tempo para compor essa banca de avaliação.

Ao Drs Carlos Lins e Luzitano Brandão Ferreira pelas amostras e acompanhamento dos pacientes.

A todos os funcionários e pessoas que trabalharam no processamento das amostras desse projeto, e as pacientes que aceitaram participar dessa pesquisa.

À minha colega Ana Carolina, que foi minha grande companheira nas tardes da SPAL.

Aos meus saudosíssimos colegas do Movimento Sem Campus, que através dos seus atos e mobilizações permitiram a existência da UnB/FCE como conhecemos hoje.

E a Deus, por que dEle e por Ele, para Ele são todas as coisas.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 PATOGENIA DAS DOENÇAS AUTOIMUNES	3
2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS DOENÇAS AUTOIMUNES	4
2.3 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES).....	5
2.3.1 Aspectos Epidemiológicos do LES	7
2.3.2 Fatores de Predisposição ao LES.....	9
2.3.2.1 Fatores Genéticos	9
2.3.2.2 Fatores Hormonais.....	10
2.3.3 Alterações Imunológicas no LES	13
2.4 A FAMÍLIA DAS CITOCINAS.....	14
2.4.1 A Família dos Interferons	15
2.4.2 Interferon Gama.....	16
2.5 POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE CITOCINAS	16
2.5.1 Polimorfismos do IFNG.....	17
3 JUSTIFICATIVA	19
4 OBJETIVOS	20
4.1 OBJETIVO GERAL.....	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
6 ARTIGO	27
RESUMO	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
Participantes da pesquisa.....	30
Extração de DNA.....	30
PCR (Reação em cadeia de Polimerase) Qualitativo	31
Análise Estatística	31
RESULTADOS.....	31
DISCUSSÃO.....	32
CONCLUSÃO	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
7 ANEXO I	38
8 ANEXO II – NORMA DA REVISTA “JORNAL BRASILEIRO DE PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL”	39

RESUMO

O Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune sistêmica com manifestação clínica heterogênea, e acomete em sua maioria mulheres em idade fértil. Sua etiologia ainda não foi completamente elucidada, mas se sabe que envolve tanto fatores genéticos como ambientais. Dentre os fatores, as citocinas têm um importante envolvimento na patogenia. A citocina interferon gama é produzida pelas células Natural Killers (NK) e por linfócitos B e T, e participa da resposta imune adaptativa, principalmente nos processos virais. O interferon gama é codificado pelo gene IFNG, e polimorfismos no gene tem sido associado às diversas patologias, entretanto em relação ao LES, poucos estudos foram realizados. Com isto, o objetivo do presente estudo é associar o polimorfismo +874 IFNG A/T (rs2430561) e as manifestações clínicas em portadoras de LES. Para isto, uma estratégia PCR alelo específica foi conduzida para identificar a presença dos alelos A e T no intron 1 em um estudo descritivo com 81 pacientes. Os estudos de associação com as características clínicas foram executados no programa SPSS versão 22.0. Os dados revelaram que o genótipo TT foi mais prevalente nos pacientes portadores de nefrites e lesões nasorais, o que reforça que provavelmente há uma relação entre o polimorfismo do IFNG e o LES, no entanto se faz necessários mais estudos para corroborar essa hipótese.

Palavras-chave: LES. Polimorfismo. IFNG

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease with a heterogeneous clinical manifestation, and affects mostly women of childbearing age. Its etiology has not yet been fully elucidated, but is known to involve both genetic and environmental factors. Among the factors, cytokines have an important involvement in the pathogenesis. The cytokine interferon gamma is produced by Natural Killers (NK) cells and by B and T lymphocytes, and participates in the adaptive immune response, mainly in viral processes. Interferon gamma is encoded by the IFNG gene, and polymorphisms in the gene have been associated with several pathologies, however in relation to SLE, few studies have been performed. Therefore, the aim of the present study is to associate the +874 IFNG A / T polymorphism (rs2430561) and the clinical manifestations in SLE. For this, a specific PCR allele strategy was conducted to identify the presence of the A and T alleles in intron 1 in a descriptive study with 81 patients. The association studies with the clinical characteristics were performed in the SPSS program version 22.0. The data revealed that TT genotype was more prevalent in patients with nephritis and nasal lesions, which reinforces that there is probably a relationship between IFNG polymorphism and SLE, but further studies are necessary to corroborate this hypothesis

Keywords: SLE. Polymorphism. IFNG

1 INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos sobre a autoimunidade surgiram em meados dos anos 1900, quando Paul Ehrlich definiu as reações do sistema imune contra o próprio organismo como “horror auto tóxico”. Nos dias de hoje sabemos que as doenças autoimunes (DAI) são causadas basicamente pelo reconhecimento de antígenos próprios por linfócitos reativos, que ativam uma cascata de reações levando aos sinais e sintomas das DAI. Atualmente os estudos demonstram que a patogênese das DAI é complexa e de origem multifatorial (WASTOWSKI *et al.*, 2008), dentre os fatores que se tornaram destaque na medicina atual estão os genéticos. Alguns polimorfismos de genes específicos têm sido cada vez mais usados como ferramenta para identificação de predisposição para certas DAI (GOODNOW, *et al.*, 2005; WASTOWSKI *et al.*, 2008).

As DAI podem ser classificadas em órgão específica ou sistêmicas. Um exemplo clássico de DAI sistêmica é o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), agravo com etiologia desconhecida. O LES progride com manifestações clínicas heterogêneas com períodos de exacerbação e remissões dos sintomas (BORBA *et al.*, 2008).

A patogênese do LES é diversificada, e uma das vias consiste na formação de imunocomplexos compostos por autoanticorpos e autoantígenos, estes complexos se depositam nas paredes dos vasos responsáveis pela microcirculação e levam a ativação de citocinas pró inflamatórias, o que pode resultar em um dano tecidual, alterações estruturais e perdas de função (HANH, 1997), outra via envolve apoptose e morte celular com falha nos processos de auto tolerância (ROSEN, 2005).

As citocinas desempenham um papel essencial na regulação da resposta inflamatória mediada por linfócitos, tal mecanismo está presente na origem das diversas DAI, incluindo no LES (THEOFILOPOULOS *et al.*, 2001).

Ao longo dos anos foram associados ao LES diversas citocinas, dentre elas, o interferon alfa, TNF-alfa e IL-10 que possuem níveis aumentados, especialmente

nos períodos de exacerbação da doença (FONSECA, 2009). Entretanto, estudos mais recentes têm demonstrado a correlação do interferon gama com os processos de autoimunidade sistêmica, especialmente no LES (POLLARD et al., 2013).

O interferon gama é produzido principalmente por linfócitos do tipo TH1 e pelas células *Natural Killers (NK)*. Ele participa da defesa contra vírus e patógenos externos e das reações inflamatórias do sistema imune, e é codificado pelo gene IFNG que está localizado no braço curto do cromossomo 12, precisamente na posição 12q24.1 (HOLANDA, 2013), o polimorfismo desse gene tem sido associado a algumas doenças autoimunes e a processos inflamatórios crônicos, parasitários e virais, além de outras patologias (PRAVICA et al., 2000; CHONG et al., 2006; PACHECO et al., 2008; HOLANDA, 2013). Estudos determinaram que o polimorfismo +874 do IFNG pode influenciar a produção de interferon gama (HOLANDA, 2013). Porém há poucos estudos sobre a influência do background genético ao prognóstico de LES.

Neste contexto, o presente trabalho dedica-se a demonstrar se há relação entre o polimorfismo do gene IFNG e o prognóstico de LES, ao avaliar se este SNP confere um fator de suscetibilidade a doença, além disto, se está relacionado a características clínicas do LES.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Patogenia das Doenças Autoimunes

O sistema imunológico humano consiste na principal linha de defesa contra microrganismos e substâncias patogênicas, embora muitas vezes substâncias não patogênicas e não infecciosas sejam capazes de causar repercussões no sistema imune. Genericamente, define-se que uma reação imunológica consiste de uma reação à moléculas (proteínas e polissacarídeos por exemplo) e substâncias químicas identificadas pelo nosso organismo como substâncias estranhas, sendo que até mesmo moléculas próprias podem dar origem a reações imunológicas, sendo estas reações envolvidas na patogenia de diversas doenças autoimunes (ABBAS E LITCHMAN, 2007).

Nossa defesa contra microrganismos e substâncias estranhas é mediada por duas linhas de respostas imunológicas, a resposta inata e a adaptativa, sendo que a inata é nossa primeira linha de defesa sendo mediada por componentes que já estavam em nosso organismo antes da infecção, como as barreiras físicas e químicas (epitélio e substâncias químicas com propriedades antimicrobianas), células fagocitárias, dendríticas e células NK, além de algumas citocinas que mediam a resposta inflamatória de células da resposta inata. A resposta adaptativa se dá por meio de uma exposição a antígenos e, como resposta, há a produção de anticorpos específicos que mediam respostas inflamatórias. As células principais da resposta adaptativa são os linfócitos e seus produtos secretados (ABBAS E LITCHMAN; 2007).

Uma das habilidades essenciais do sistema imune é a distinção de antígenos próprios e não-próprios, denominada tolerância imunológica, que consiste na ausência de resposta a antígenos do próprio organismo (WASTOWSKI et al., 2008). A tolerância imunológica se dá de duas maneiras, a tolerância central que induz a morte dos linfócitos T e B reativos durante o seu amadurecimento nos órgãos linfoides centrais, e a tolerância periférica que silencia as células T reativas que escaparam da seleção natural e tem potencial de causar lesão, essas células podem

ser inativadas por mecanismos que induzam a anergia celular, supressão por células T reguladoras e morte celular por apoptose (ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013).

A perda desta autotolerância e o desenvolvimento de uma autoimunidade parece ser o mecanismo básico da patogênese das DAI, entretanto diversos genes de susceptibilidade possuem um papel importante no desenvolvimento das doenças autoimunes. Estudá-los parece ser o caminho para a total compreensão dos mecanismos envolvidos nessas patologias (GOODNOW et. al., 2007; ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013).

2.2 Características Gerais das Doenças Autoimunes.

As doenças autoimunes são um grupo de mais de 100 doenças que possuem como característica comum uma desordem do sistema imune, que se torna reativo a antígenos próprios. Contudo a simples presença de auto anticorpos ou linfócitos auto reativos não implicará necessariamente no desenvolvimento de uma doença autoimune. (ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013; WASTOLWSKI et. al., 2009).

As DAI podem ser classificados de acordo com a abrangência dos órgãos afetados, portando podem ser órgão-específicas ou sistêmicas, a depender da resposta imune. Quando esta resposta imune a auto antígenos ocorrerem contra células não específicas de diversos órgãos e sistemas, há então uma DAI sistêmica como por exemplo o LES, quando a resposta autoimune for dirigida a antígenos de produção restrita a um órgão ou sistema tem-se um DAI órgão-específica, como no caso da tireoidite de Hashimoto. (ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013; WASTOLWSKI et. al., 2009).

Outro meio de dividir as DAI é segundo a resposta imune responsável pelo início da doença podendo ser humoral ou celular. A resposta imune humoral é mediada por auto anticorpos, um exemplo clássico é a *miastenia gravis*, que se caracteriza pela ligação de auto anticorpos nos receptores de musculares de acetilcolina levando a sua degradação e culminando nos sinais e sintomas da

doença. Já a resposta celular linfócitos auto reativos são responsáveis pela doença, como no caso do *diabetes mellitus* tipo 1, onde as células β são destruídas após um resposta celular citotóxica. (ABBAS e LITCHMAN, 2007; ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013; WASTOLWSKI et. al., 2009).

Contudo de modo geral as DAI possuem como característica geral comum a presença de mecanismos de origem da doença que possuem bases multifatoriais, que envolvem tanto as reações complexas do sistema imune, como fatores hormonais, predisposição genética e exposição ambiental. (GOODNOW et. al., 2007; WASTOLWSKI et. al., 2009).

2.3 Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)

O LES como o próprio nome sugere é classificado como uma DAI sistêmica, afetando diversos órgãos com sinais e sintomas heterogêneos e comportamento clínico variável (ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013). A origem da doença permanece indeterminada até o presente momento, porém sabe-se que é uma doença inflamatória crônica causada por reações autoimunes que envolvem fatores genéticos, ambientais e hormonais. (SATO et. al., 2002; FONSECA, 2009)

O mecanismo fundamental de patogenia do LES é a incapacidade de manter a auto tolerância, e pode acarretar a grande produção de auto anticorpos com potencial de causar dano aos tecidos de modo direto ou com a formação de complexos que são depositados nos tecidos (ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013).

O diagnóstico do LES é realizado seguindo os critérios propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR), ao todo são 11 critérios, dos quais o paciente necessita apresentar quatro ou mais critérios de forma seriada ou simultânea durante qualquer intervalo de observação para enquadrar-se no LES (ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013; SATO et.al, 2002).

Esses critérios foram criados com o objetivo principal de padronizar a seleção de pacientes para ensaios clínicos e demais estudos científicos, contudo durante a prática médica embora não sendo comum é possível encontrar pacientes portadores

de LES que não apresentam quatro ou mais critérios dos 11 propostos pelo ACR para serem classificados como portadores do LES (SATO et.al, 2002). A descrição dos critérios está resumida na Figura 1.

Figura 1: Critérios de classificação do LES baseado no *American College of Rheumatology* (ACR) revisados em 1997.

Critérios	Definições
1. Erupção malar	Eritema fixo, plano ou elevado, acima das eminências malares, que tende a poupar as pregas nasolabiais
2. Erupção discoide	Placas eritematosas elevadas com escamas queratóticas aderentes e tamponamento folicular; lesões cicatríciais podem ocorrer em lesões antigas
3. Fotossensibilidade	Eritema cutâneo resultante de reação rara à luz solar, pelo histórico do paciente ou observação do médico
4. Úlceras orais	Úlceras orais ou nasofaríngeas, em geral indolores, observadas por um médico
5. Artrite	Artrite não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizada por dor, edema ou derrame
6. Serosite	Pleurite — histórico convincente de dor pleurítica, atrito pleural auscultado por um médico ou evidência de derrame pleural ou Pericardite — documentada pelo eletrocardiograma, atrito pericárdico ou derrame pericárdico
7. Distúrbio renal	Proteinúria persistente $>0,5$ g/dL ou $> 3+$ se não for feita a quantificação ou Cilindros celulares — podem ser de hemácias, hemoglobina, granulocitos, tubulares ou mistos
8. Distúrbio neurológico	Convulsões — na ausência de causas medicamentosas ou distúrbios metabólicos (p. ex., uremia, cetoacidose ou distúrbio eletrolítico) conhecidos ou Psicose — na ausência de causas medicamentosas ou distúrbios metabólicos conhecidos (p. ex., uremia, cetoacidose ou desequilíbrio eletrolítico)
9. Distúrbio hematológico	Anemia hemolítica — com reticulocitose ou Leucopenia — $<4,0 \times 10^9/L$ ($4.000/mm^3$) total em duas ou mais ocasiões ou Linfopenia — $<1,5 \times 10^9/L$ ($1.500/mm^3$) em duas ou mais ocasiões ou Trombocitopenia — $<100 \times 10^9/L$ ($100 \times 10^9/mm^3$) na ausência de causas medicamentosas
10. Distúrbio imunológico	Título anormal de anticorpo anti-DNA nativo ou Anti-Sm — presença de anticorpos contra o antígeno nuclear Sm ou Achados positivos para anticorpos antifosfolípidios com base em (1) nível sérico anormal de IgG ou IgM anticardiolipina, (2) teste positivo para anticoagulante lúpico usando um método padronizado ou (3) resultado falso-positivo no teste sorológico para sífilis sabidamente positivo por pelo menos seis meses e confirmado pelo teste de imobilização do <i>Treponema pallidum</i> ou teste de fluorescência da absorção do anticorpo antitreponema
11. Anticorpo antinuclear	Título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência ou ensaio equivalente na ausência de medicamentos reconhecidamente associados à síndrome do lúpus induzido por medicamento

(Fonte: ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013 – adaptado)

A análise laboratorial também possui papel essencial no diagnóstico do LES. A pesquisa das alterações hematológicas é importante tanto para o diagnóstico tanto para o seguimento clínico do paciente, mas é a pesquisa de anticorpos ou fatores

antinucleares (FAN) que são essenciais para a triagem dos casos (SATO et.al, 2002). Conforme o I Consenso Brasileiro sobre Laudos de FAN HEP-2, o FAN deve ser pesquisado por meio de técnicas de imunofluorescência indireta usando como substrato as células HEP-2V (DELLAVANCE et al., 2001; SATO et.al, 2002). É imprescindível ressaltar que o FAN não é específico do LES, mas devida a sua alta sensibilidade, a pesquisa desse auto anticorpo encontra seu lugar na triagem clínica dos pacientes suspeitos. É possível a existência de alguns casos de pacientes portadores de LES, mas que possuem pesquisa negativa de FAN, recomenda-se então a pesquisa de outros anticorpos como o anti-SSa/Ro, anti-DNA reativo, anti-Sm e antinucleosomo, podendo contribuir para uma caracterização mais precisa do quadro (SATO et.al, 2002).

O prognóstico da doença tem melhorado muito dos últimos 40 anos, boa parte devido ao aumento do número de diagnósticos precoces e sua referência a serviços especializados, e aos avanços tecnológicos nos tratamentos e monitoramento da doença, sendo que atualmente estima-se que 83% sobrevivam 15 anos após o diagnóstico da doença (APPENZELLER; COSTALLA, 2004). Um fato importante para a sobrevida da doença é um maior Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), melhores taxas de alfabetização e maior expectativa de vida, ou seja, fatores socioeconômicos estão ligados com a taxa de sobrevivência ao LES (VASUDEVAN E GINZLER, 2011).

A principal causa de morte no LES está associada com a atividade da doença, a complicações no seu tratamento e o surgimento de comorbidades, além de outras causas não relacionadas a doença (APPENZELLER; COSTALLA, 2004).

2.3.1 Aspectos Epidemiológicos do LES

Por ser uma doença com sintomas multiformes a obtenção de dados epidemiológicos de incidência e prevalência mostram resultados variados conforme a região geográfica pesquisada (VASUDEVAN E GINZLER, 2011). Grande parte dos estudos epidemiológicos se concentra em países da Europa e Estados Unidos, o

que dificulta a compreensão da patologia em terras brasileiras, já que é um povo com alto grau de miscigenação soma-se o fato de existirem poucas publicações brasileiras acerca do tema (NAKASHIMA et al., 2011)

A doença é considerada rara e sua incidência e prevalência varia conforme os grupos raciais e étnicos (ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013). A predominância no sexo feminino chama a atenção (9:1), estudos norte-americanos estimam que a doença é mais frequente em mulheres em idade fértil na proporção de 1 a cada 700 mulheres em idade reprodutiva (ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013; BORBA E. F. *et al*, 2008; PONS-ESTEL, 2010), sendo que o LES é mais comum e possui maior gravidade em mulheres negras, chegando a afetar uma em cada 245 mulheres deste grupo (ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013). Na população norte-americana a prevalência estimada é de 15 a 50 para cada 100.000 habitantes (RUS, 2007; PONS-ESTEL, 2010)

O LES já foi descrito ao menos em seis continentes (Europa, América do Norte, América do Sul, África, Ásia e Austrália), é menos incidente na África, porém comum em afrodescendentes de diversos continentes (o que sugere a participação de fatores ambientais na etiologia da doença). A doença também é mais comum na população aborígine da Austrália e em indígenas nativos americanos do Canadá e Estados Unidos (PONS-ESTEL, 2010).

Embora raro o LES também possa acometer a população infanto-juvenil, sendo considerado mais grave e com o prognóstico relacionado a idade de início da doença. Estudos sugerem que na América do Norte e na Europa a taxa de incidência anual seja de 1 para 100.000 jovens com idade <16 anos (PONS-ESTEL, 2010).

A mortalidade no LES também varia conforme a região, em sociedade com IDH maior e mais industrializadas a morte está relacionada com o tempo decorrente da doença, sendo que uma morte tardia é considerada 5 anos após o aparecimento dos primeiros sintomas (PONS-ESTEL, 2010; VASUDEVAN E GINZLER, 2011). Estudos latino-americanos têm encontrados taxas de sobrevivência de 15 a 20 anos em 80% dos pacientes (FERNÁNDEZ et al., 2007; PONS-ESTEL, 2010). Entretanto regiões com Ásia ainda não conseguiram igualar suas taxas de sobrevivência ao dos

países Europeus e Norte Americanos, sugerindo a importância da situação socioeconômica como fatores no prognóstico do LES. (PONS-ESTEL, 2010)

Os dados epidemiológicos do LES em pacientes do sexo masculino são escassos. Estudos com grandes populações (>150 pacientes homens) sugerem que o LES se manifesta mais gravemente, sendo a sobrevivência inferior à da população feminina (PONS-ESTEL, 2010).

2.3.2 Fatores de Predisposição ao LES

2.3.2.1 Fatores Genéticos

O LES possui forte associação familiar, sendo que foram encontrados uma prevalência familiar em parentes de 1º grau de 5,6% (ALARCON-SEGOVIA et al., 2005), e a concordância da doença em gêmeos dizigóticos varia de 2 a 5% e em gêmeos monozigóticos chega até 30% (MICHEL et al., 2001; MOSER et al., 2009). Esses dados sugerem que por trás da doença há um forte componente genético atuante, embora não seja única causa, confere um importante fator de predisposição (SILVA, 2014).

Conforme os avanços dos estudos sobre LES notou-se o que cada vez mais alterações genéticas estariam relacionadas com a doença, entretanto é impossível afirmar que a patologia seja causada pela alteração de um único gene específico. O que se tem sugerido é que haja um conjunto de alterações genéticas que quando combinadas a outros fatores deem origem ao LES (ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013).

Diversas doenças autoimunes estão relacionadas com alterações ao locus HLA (ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013), situado no braço curto do cromossomo 6 o sistema HLA é conhecido pelo seu polimorfismo e por conferir tanto um fator de proteção quanto de susceptibilidade a diferentes DAI (ALVES et al., 2006). No caso do LES estudos indicam que há uma correlação entre os alelos HLA na região de classe II no loci HLA-DRB1*0301 e HLA-DRB1*1501 e a susceptibilidade a doença (ALVES et al., 2006; ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013).

Os polimorfismos de bases únicas (SNP) em diversos genes de Interleucinas também parecem ter forte associação com a doença e suas manifestações clínicas. Pacientes com LES geralmente possuem uma produção aumentada de citocinas pró inflamatórias, alterações nas regiões promotoras nesses genes podem acarretarem alterações no perfil de expressão (SILVA, 2014).

Estudos revelam que polimorfismos nos genes TNFA (-308 G/A) e IL12(+1188 A/C) estão associados a susceptibilidade ao LES, porém os resultados demonstraram que essas SNP não estavam relacionados com o nível de atividade da doença (SILVA, 2014). Um estudo de pesquisadores americanos demonstrou que alterações VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) na região promotora do gene IL6 estaria relacionado com aumento da produção e atividade de linfócitos B e com o nível de atividade de doença (LINKER-ISRAELI et al., 1999).

Contudo os estudos que tentam correlacionar alterações genéticas ao LES ainda são escassos e muitas vezes contraditórios, revelando que embora se tenha a certeza da importância da genética como fator de predisposição a doença, a questão ainda não está completamente elucidada, sendo necessários mais estudos nesta área (SILVA, 2014)

2.3.2.2 Fatores Hormonais

O fato de o LES acometer em sua maioria mulheres em idade fértil é sugestivo de que há um componente hormonal envolvido na patologia da doença (TISKIEVICZ et al., 2005; TISKIEVICZ, 2008). O estrogênio foi um dos primeiros hormônios sexuais a serem relacionados com o LES, na década de 80, casos de LES foram reportados após as pacientes serem submetidas à terapia hormonal com estrogênio (BARRETT, 1986).

Esta associação hormônio e patologia autoimune pode ser devido ao envolvimento do estrogênio na estimulação da resposta de linfócito B e na inibição de resposta mediada por linfócito T, além disso o estrogênio desloca o equilíbrio de células Th1/Th2 aumentando a produção de Th2 (LI et al, 2011). Os estrógenos também parecem modular a expressão de receptores para glicocorticoides na

hipófise (MEDEIROS et al., 2007; LI et al, 2011), ele é capaz também de exacerbar a atividade fagocitária das células apresentadores de antígenos de macrófagos. Teoricamente esses fatores aumentariam a propensão ao agravamento da doença (LI et al, 2011).

O ciclo menstrual parece ter influência nos períodos de atividade da doença, de modo que as evidências sugerem que o agravamento e agudização da doença está presente em pacientes expostas a níveis aumentados do estrogênio, como por exemplo na puberdade, nos períodos pré-menstruais e na gravidez, de modo que situações que levam ao hipoestrogenismo como a amamentação e menopausa conferem um fator de proteção (LATEEF, 2012; TISKIEVICZ, 2008).

Além disto, os pacientes com LES apresentam o metabolismo alterado do estrogênio, com um aumento na 16 α hidroxilização da estrona (estrogênio com ação mitogênica) o que contribui para a manutenção do estado inflamatório dos pacientes com LES, já que induz a proliferação das células do sistema imune (CUTOLO, et al, 2006).

Um achado comum em pacientes com LES é o polimorfismo de Receptores de Estrogênicos (RE) que foi relacionado com o aumento da frequência de serosites e rashes cutâneos (ZANETTE et al., 2014). Essas alterações na função ou estrutura dos RE determinam a atividade biológica final desse hormônio nas células imunes. Estudos indicam que alterações em RE aumentam em 3 vezes o risco do desenvolvimento de LES em idade precoce (HOLROYD, 2009).

Estudos demonstram que pacientes portadoras de LES com presença de anticorpos antifosfolípides (aPL+) quando em uso de contraceptivos orais as bases de estrógenos experimentam exacerbações da doença, sendo este um método de contracepção não indicado para estas pacientes (SOUBHIA; MONTEIRO; MENDES, 2015).

Entretanto as pesquisas sobre terapia hormonal com estrógenos exógenos mostram resultados inconsistentes (PETRI et al., 2005;BUYON et al., 2005). Tanto a menarca precoce quanto a tardia tem demonstrado associação com o maior risco de desenvolvimento de LES, além disso, a menopausa precoce tem sido associada a pacientes portadoras de LES, mas a terapia de reposição hormonal em mulheres saudáveis não parece ser um fator de risco (COOPER et al., 2002).

Os hormônios androgênicos têm sido relatados em níveis baixos em diversas doenças autoimunes, entre elas a LES. Pacientes com LES que demonstram supressão da testosterona sérica apresentam em sua maioria a oxidação acelerada desse hormônio, o que pode estar relacionado com efeitos imunomodulatórios uma vez que a testosterona suprime a produção de anticorpos anti-DNA (ZANDMAN-GODDARD; PEEVA; SHOENFELD, 2007).

Outro hormônio que tem se destacado na sua participação no LES seria a prolactina. Alguns autores notaram que os níveis séricos de prolactina aparecem aumentados em cerca de 30% de pacientes com lúpus, esse número sobe para até 69% se forem considerados apenas pacientes na fase ativa da doença (PACILIO M, et al, 2001).

A prolactina é um hormônio multifuncional que pertence à superfamília de receptores de citocinas, indicando que esse hormônio possua atividade inflamatória similar a das citocinas (BUCKLEY, 2001). A prolactina também age na proliferação de linfócitos T, os protegendo contra a morte programada, aumentando assim a sobrevivência da célula, também é sugerido que ela tenha a capacidade de estimular outras células como linfócitos B e células NK (MATERA; MORI; GEUNA, 2001; BUCKLEY, 2001).

A prolactina tem sua produção aumentada durante a gestação, e isto pode ter relação com o fato de que um terço das gestantes com lúpus possuem primeira manifestação da doença durante a gestação (OSTENSEN M, 1999). Sendo que a gestação de uma paciente com lúpus possui um mau prognóstico materno-fetal, com maior probabilidade de exacerbação dos sintomas da doença durante a gestação e morte fetal e materna, sendo recomendado que a gravidez em pacientes com lúpus seja programada para períodos de remissão da doença (SOUBHIA; MONTEIRO; MENDES, 2015).

Embora seja sugestiva a participação do estrogênio, da prolactina e outros hormônios andrógenos na patogênese do LES, os mecanismos detalhados desse processo também permanecem desconhecidos, dado que os estudos são apenas de correlação ou associação, não de causa e efeito (TISKIEVICZ et al., 2005; TISKIEVICZ, 2008; SOUBHIA; MONTEIRO; MENDES, 2015).

2.3.3 Alterações Imunológicas no LES

As alterações imunológicas presentes durante o curso do LES em pacientes acometidas estão bem caracterizadas. Em linhas gerais as manifestações clínicas do LES são provenientes de um aumento exacerbado da produção de anticorpos auto reativos que formam imunocomplexos (ligações antígeno-anticorpo) (SINAI et al, 2014).

A fonte mais provável de auto antígenos que darão origem a auto anticorpos são os restos apoptóticos (RAHMAN; ISENBURG, 2008). A apoptose é um processo ordenado de destruição celular e remoção de restos celulares por meio de fagocitose com ausência de resposta inflamatória (FRANZ S, et al). No LES, observa-se excessos desses restos celulares apoptóticos no interior das células fagocíticas, provavelmente esses restos tenham origem em populações celulares com o *turn-over* aumentado ou são oriundos de alterações na expressão de componentes do sistema complemento, de todo modo esses restos serviriam para produção de anticorpos anti-nucleares com funções pró inflamatórias (RAHMAN; ISENBURG, 2008).

Uma das alterações imunológicas mais relevantes do LES são a presença de anticorpos anti-nucleares (AANs), esses anticorpos são dirigidos à diversos antígenos nucleares, são eles: os anticorpos contra o DNA, anticorpos contra as histonas, anticorpos contra outras proteínas não histonas ligadas ao RNA e anticorpos contra antígenos nucleolares (ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013). O método mais indicado para a detecção desses AANs é a imunofluorescência indireta (IF), sendo que 95% dos pacientes apresentam resultados positivos para AANs (BORBA et al, 2008) Os mais comuns associados ao LES são Anti-DNA nativo (dupla-hélice), que possui forte associação com a nefrite lúpida, Anti-DNA desnaturado (hélice simples), Anti-SSA (RO), Anti-SM entre outras que também podem estar presentes em outras DAI, esses AANs formam complexos imunes em diversos tecidos e órgão com potencial de desencadear reações inflamatórias (ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013).

Esses AANs são produzidos em sua maioria por linfócitos B. O modo pelos quais esses anticorpos auto-reativos escapam dos mecanismos de autotolerância são desconhecidos (FONSECA, 2009).

Outras alterações imunológicas, além das já citadas, foram descritas em alguns pacientes portadores de LES, tais como a produção de anticorpos antifosfólípedes, aumentando assim o risco de trombose. Pacientes com lúpus também podem apresentar VDRL falso positivo (ABBAS; ASTER; KUMAR, 2013; BORBA et al, 2008).

2.4 A família das Citocinas

As citocinas são um grande grupo heterogêneo de proteínas solúveis produzidas por diferentes células e possuem como função mediar e regular aspectos da imunidade inata e adaptativa (ABBAS e LICHTMAN, 2007).

As citocinas possuem um papel importante na progressão de DAI devido sua relação com os processos inflamatórios (SILVA, 2014). Vários polimorfismos descritos na literatura podem influenciar a produção de citocinas, sendo esses associados com diversas patologias como câncer, condições inflamatórias e DAI (FRANCESCHI et al., 2009).

A nomenclatura das citocinas é aleatória e muitas delas foram nomeadas arbitrariamente de acordo com uma de suas funções como por exemplo o fator de necrose tumoral (TNF), e outras são denominadas de interleucinas, acompanhadas de um sufixo numérico, visto que as pesquisas iniciais consideravam sua produção e ação exclusiva nos leucócitos (ABBAS e LICHTMAN, 2007).

A síntese das citocinas é iniciada por meio da ativação da transcrição gênica como um resultado de ativação celular. Essa ativação celular é transitória e os RNAm que codificam a maioria das citocinas são instáveis e rapidamente degradados. Algumas propriedades gerais das citocinas é capacidade de atuação em diversas células e a capacidade de exercer múltiplas funções biológicas, sendo que entre elas pode existir tanto um sinergismo como antagonismo de ação. O local

de ação da maioria das citocinas está relacionado com o local de produção, sendo que a maioria age nas proximidades, podendo ser uma atuação parácrina ou autócrina, mas há citocinas como o TNF α com importantes ações sistêmicas (ABBAS e LICHTMAN, 2007).

As citocinas podem ser produzidas tanto por células da imunidade inata como macrófagos, células dendríticas e mastócitos e contribuem para o processo de defesa do hospedeiro contra vírus e bactérias impulsionando processos inflamatórios. Outras citocinas são produzidas por células do sistema imune adaptativo, como células T auxiliares regulando resposta imunológicas, como a diferenciação e proliferação de células B. Algumas citocinas ainda atuam como fator de crescimento para hematopoese (ABBAS e LICHTMAN, 2007).

As diferentes citocinas podem ser enquadradas em grupos distintos: interleucinas, que consistem em uma grande família de citocinas heterógenas com atividades biológicas sendo que os polimorfismos das interleucinas IL2, IL6, IL12, IL17 e IL23 já foram relacionados com o LES (SILVA et al, 2014; VARELLA; FORTE, 2001); os TNF cuja a principal atividade biológica é a citólise de células neoplásicas, sendo que o TNF α possui um papel na lesão descrito no LES; os interferons; fator estimulador de colônias (CSF) e fator de estimulação de crescimento (TGF- β) (SILVA, 2014; VARELLA; FORTE, 2001; HOLANDA, 2013).

2.4.1 A Família dos Interferons

A primeira substância denominada interferon (IFN) foi descrita em 1950 e foi nomeado de acordo com sua capacidade de interferir na replicação viral. Hoje é de conhecimento que os interferons são uma grande família de citocinas que possuem correlação estrutural e além de exercerem atividades na modulação da imunidade medeiam a resposta natural e inicial a infecções virais (LURIE, 2005).

Os IFNs são divididos em dois tipos. Os IFN de tipo I tem como sua principal função biológica a limitação da propagação de infecções por vírus e parasitas, eles são produzidos por monócitos, macrófagos, células linfoblásticas e fibroblastos.

Fazem parte dos IFNs tipo I os Interferon alfa e Interferon beta, embora ambos tenham ação nos mesmos receptores suas funções biológicas são distintas (VARELLA; FORTE, 2001). O IFN de tipo II também denominado interferon autoimune ou Interferon gama é produzido por células T efetoras após uma resposta imune adaptativa (LURIE, 2005).

2.4.2 Interferon Gama

O Interferon Gama é uma citocina multifuncional, solúvel e dimerizada que pesa entre 20 a 25 KD, é secretado por células NK e pelas células T e B sendo sua principal atividade a modulação da resposta imune adaptativa, possui também ação sinérgica aos Interferon alfa e Interfeon beta na atividade antiviral. Anteriormente era denominado de fator ativador de macrófago, o que revela sua relação com as atividades contra antígenos bacterianos, ele também atua como citocina chave no controle da resposta imune mediada por linfócitos Th1 (VARELLA; FORTE, 2001; LURIE, 2005).

O Interferon gama também é responsável pelo aumento da expressão das moléculas MHC de classe I e II, em monócitos estimula a produção de receptores para IgG além de induzir a produção de TNF α nessas células, ele também aumenta a atividade citotóxica de células NK (VARELLA; FORTE, 2001; LURIE, 2005).

2.5 Polimorfismos Genéticos de Citocinas

Polimorfismos genéticos são variações genéticas em que o alelo menos comum corresponde a mais de 1% população. Os tipos mais comuns de polimorfismos são os VNTRs (Número Variável de Repetições em Tandem-*variable number tandem repeat*) e os SNPs (Polimorfismos de Nucleotideos Únicos) (SILVA, 2014; SOEMEDI et al, 2014)

Os polimorfismos humanos podem ser observados tanto no sítio promotor ou na região 5'flanqueadora; nos éxons ou na região codante; nos íntrons ou na região não traduzida 3' (3'UTR) (HAUKIM et al, 2002).

Polimorfismos nas regiões promotoras de genes são capazes de alterar o perfil de expressão de fatores de transcrição levando um aumento ou diminuição na produção dos produtos biológicos, enquanto os polimorfismos em regiões codantes do gene podem alterar a sequência de aminoácidos, tendo impacto na conformação tridimensional de proteínas, comprometendo assim sua função (HAUKIM et al, 2002).

Várias doenças, inclusive as DAIs vem sendo associadas a polimorfismos de citocinas, esses polimorfismos podem estar associados a fatores de predisposição a doença, progressão e gravidade do caso ou conferirem fatores de proteção, visto que essas alterações genéticas podem afetar a função natural dessas moléculas (SILVA, 2014; KIM et al., 2009).

Todavia as publicações acerca do tema são muitas vezes controversas, e no que diz respeito aos polimorfismos de citocinas associados ao LES há uma escassez de publicações (SILVA, 2014).

2.5.1 Polimorfismos do IFNG

O Interferon gama é codificado por um gene que está localizado no braço longo do cromossomo 12 na região 24.1, mede 5,4kb e codifica uma proteína de 146 aminoácidos (HOLANDA, 2013).

Vários polimorfismos têm sido observados na região não codantes do gene IFNG, vários deles associados a DAI. Estudos já demonstram que a repetição microsatélite CA na posição -179T/G está associada a alterações na produção de Interferon gama e por consequência está relacionada a condições inflamatórias crônicas (PRAVICA *et al.*, 2000; CHONG *et al.*, 2006; PACHECO *et al.*, 2008; HOLANDA, 2013; TANGWATTANACHULEEPORN *et al.*, 2007).

Outro polimorfismo que configura entre os principais desse gene é o da região +874 A/T. Um estudo tailandês demonstrou que a frequência alélica do polimorfismo IFNG +874 T/A entre indivíduo com LES e o grupo controle não produziu diferenças estatísticas, entretanto o mesmo estudo sugeriu que este polimorfismo pode ser usado como marcador para artrite em pacientes com LES, visto que foram encontrados resultados significativos do alelo A em pacientes portadoras de LES e artrite (TANGWATTANACHULEEPORN et al., 2007).

Além disso, um estudo brasileiro conduzido por Silva e colaboradores (2014) demonstrou em uma amostra de 99 pacientes portadores de LES e 100 indivíduos controles saudáveis, que a frequência alélica T/A do polimorfismo +874 T/A do gene IFNG possui diferenças estatísticas, sendo que a frequência é superior nas pacientes acometidas por LES, sugerindo que esse polimorfismo seja um fator de suscetibilidade para doença. O estudo não encontrou correlação entre o polimorfismo descrito e as manifestações clínicas da doença (SILVA et al., 2014).

Quanto ao polimorfismo IFNG +874 A/T, é digno de nota que portadores do alelo selvagem T produzem quantidades normais de interferon gama, enquanto os portadores do alelo mutante A tendem a produzir níveis menores de interferon gama (MATOS et al, 2007). Em adição, Holanda (2013) descreveu em sua tese que a análise do polimorfismo +874 A/T gera três possíveis genótipos A/A, T/A e T/T cada um relacionado com a produção de interferon gama: baixo, intermediário e alto produtor, respectivamente. (HOLANDA, 2013). Segundo Pravica et al (2000) uma SNP localizada no primeiro íntron do gene IFNG junto a região de repetição CA +874 pode influenciar negativamente a produção de interferon gama.

3 JUSTIFICATIVA

A compreensão da Patogenia de LES pode auxiliar na determinação do seu prognóstico. Além disto, estes estudos podem ser subsídios para criação de novas ferramentas diagnósticas, que poderão ser úteis na área de Análises Clínicas.

A expressão de elevados índices de interferon gama faz parte da patogênese do LES (KIM et al., 2009). Como já abordado na revisão de literatura, essa citocina possui uma atividade de modulação do sistema imune que ativa vários mecanismos capazes de induzir a inflamação, sendo relacionado com os processos de autoimunidade sistêmica (POLLARD *et al.*, 2013).

Assim, os polimorfismos presentes em regiões que afetam a transcrição do referido gene tem sido associado a gravidade, susceptibilidade e manifestações clínicas do LES (SILVA et al 2014; KIM et al 2009).

Devido às alterações genéticas, pode ocorrer a produção alterada dessa citocina, e assim fica sugestiva a participação dos polimorfismos do gene IFNG na patogenia do LES, sendo necessários mais estudos, em outras populações portadoras de LES, para a completa compreensão desses mecanismos (KIM et al 2009).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

O principal objetivo desse trabalho consiste em verificar associação entre o polimorfismo do gene IFNG +874 A/T e o prognóstico de LES.

4.2 Objetivos Específicos

- a)** Realizar revisão da literatura sobre polimorfismo +874 A/T do gene IFNG e do LES.
- b)** Realizar a padronização dos procedimentos laboratoriais necessários para o estudo do polimorfismo +874 A/T do gene IFNG em amostras de pacientes com LES.
- c)** Investigar a associação do polimorfismo +874 A/T do gene IFNG ao prognóstico de LES (características clínicas) em uma amostra brasileira da região Centro-Oeste.

5 Referências Bibliográficas

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 267 p.
2. ABBAS, Abula; ASTER, Jon; KUMAR, V. **Robbins - Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 928 p.
3. ALARCON-SEGOVIA D, Alarcon-Riquelme ME, Cardiel MH, Caeiro F, Massardo L, Villa AR and Pons-Estel BA. Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. **Arth. & Rheum.**, v.52, n.4, 2005.
4. APPENZELLER, Simone; COSTALLA, Lilian Tereza Lavras. Análise de Sobrevida Global e Fatores de Risco para Óbito em 509 Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). **Rev Bras Reumatol**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 3, p.198-205, jun. 2004.
5. ALVES, Crésio et al. Antígenos de histocompatibilidade humanos e dermatologia: da pesquisa para a prática clínica. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 1, p.65-73, fev. 2006.
6. BARRETT C, Neylon N, Snaith ML: Oestrogen-induced systemic lupus erythematosus. **Br J Rheumatol** 25: 300-1, 1986
7. BORBA, E. F. *et al.* I Consenso de Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Rev Bras Reumatol**, São Paulo,v. 48, n.4, p. 196-207, jul/ago, 2008
8. BUCKLEY AR: Prolactin, a lymphocyte growth and survival factor. **Lupus** v.10, p.684-90, 2001.
9. BUYON, JP et al. The effect of combined estrogen and progesterone hormone replacement therapy on disease activity in systemic lupus erythematosus: a randomized trial. **Ann Intern Med**, v. 142, n. 21, p.953-962, jun. 2005.
10. CHONG, W. P., et al. The interferon gamma gene polymorphism +874 A/T is associated with severe acute respiratory syndrome. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, p. 1-4, 2006.
11. COOPER, Glinda S. et al. Hormonal and reproductive risk factors for development of systemic lupus erythematosus: Results of a population-based, case-control study. **Arthritis & Rheumatism**, v. 46, n. 7, p.1830-1839, jul. 2002.

12. CUTOLO, M. et al. and STRAUB, R. H. Estrogens and Autoimmune Diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1089, p.538–547, 2006.
13. DELLAVANCE, Alessandra et al. I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN HEp-2. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p.207-216, out. 2001.
14. FRANCESCHI DAS et al. (2009) Otimização de metodologia PCR-SSP para identificação de polimorfismos 76 genéticos de TNF e IL2. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v.31, n.4 p.1-6.
15. FRANZ S, et al. Apoptosis and autoimmunity: When apoptotic cells break their silence. *Curr Rheumatol Rep* v. 8, p.245-24, 2006.
16. FERNÁNDEZ, Mónica et al. A multiethnic, multicenter cohort of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) as a model for the study of ethnic disparities in SLE. **Arthritis & Rheumatism**, v. 57, n. 4, p.576-584, 2007.
17. FONSECA, Samuel Barbosa. **LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO: CAUSAS, MECANISMOS PATOLÓGICOS E ALVOS TERAPÊUTICOS FUTUROS**. 2009. 14 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências Biológicas, Icbas-up, Universidade do Porto, Porto, 2009.
18. GOODNOW, C.C.; SPRENT, J.; GROTH, B.F.; VINUESA, C.G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. **Nature**, v. 435, p.590-7, 2005.
19. HAHN, B.H. Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. In: WN, Kelley et al. **Textbook of Rheumatology vol 2**. 5. ed. Philadelphia: Saunders Co, 1997. p. 1089-1103.
20. Haukim N, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 2. **Genes Immun**. v.3, n.6, p.313-30, 2002.
21. HOLANDA, Marcelo Teixeira de. **Frequência dos Polimorfismos dos Genes de Interferon Gama (IFNG +874 T/A) e da Óxido Nítrico Sintase Induzida (NOS2A -954G/C) em uma Coorte de 313 Pacientes na Fase Crônica da Doença de Chagas e Associação com Presença e Gravidade de Cardiopatia**. 2013. 98 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.
22. HOLROYD CR, Edwards CJ. The effects of hormone replacement therapy on autoimmune disease: rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Climateric**. v.12,n.5, p378-86, 2009.

23. KIM, K. et al. Interferon-gamma gene polymorphisms associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Annals Of The Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 6, p.1247-1250, 16 nov. 2009
24. LATEEF A, Petri M. Hormone replacement and contraceptive therapy in autoimmune diseases. **J Autoimmunity**.v.38 ,n. 2, p.170-6, 2012.
25. LI RH, Gebbie AE, Wong RW, Ng EH, Glasier AF, Ho PC. The use of sex hormones in women with rheumatological diseases. **Hong Kong Med J**. v.17, n.6, p.487-91, 2011.
26. LINKER-ISRAELI, M et al. Association of IL-6 gene alleles with systemic lupus erythematosus (SLE) and with elevated IL-6 expression. **Genes Immun**, v. 1, n. 1, p.45-52, set. 1999.
27. LURIE, Robert H. Interferons: Mechanisms of Action. In: PLATANIAS, Leonidas C. **Citokines and Cancer**. Nova York: Springer Verlag NY, 2005. Cap. 3. p. 45-68.
28. MATERA L, MORI M, GEUNA M: Prolactin in autoimmunity and anti-tumor defense. **J Neuroimmunol**, v.109 p.47-55, 2001.
29. MATOS, G. I. et al. IFNG+ 874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence Leishmania induced IFN- γ production. **BMC infectious diseases**, v. 7, n. 1, p. 33, 2007.
30. MEDEIROS, Sebastião Freitas de et al. Efeitos da terapia hormonal na menopausa sobre o sistema imune. **Rev Bras Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 11, p.594-600, nov. 2007.
31. MICHEL M, Johanet C, Meyer O, Frances C, Wittke F, Michel C, Arfi S, Tournier Lasserre E, Piette JC. Familial lupus erythematosus. Clinical and immunologic features of 125 multiplex families. **Medicine**. v.80, n.3, p.153–158, 2001.
32. MOSER KL, Kelly JA, Lessard CJ, Harley JB. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. **Genes Immun**, v. 10, n. 5, p.373– 379, 2009.
33. NAKASHIMA, Carlos Alberto Kenji et al. Incidência e aspectos clínico-laboratoriais do Lúpus eritematoso sistêmico em cidade do Sul do Brasil. **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo, v. 51, n. 3, p.235-239, jun. 2011.
34. OSTENSEN M: Sex Hormones and Pregnancy in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. **Ann NY Acad Sci** v.876, p.131-43, 1999.

35. PACILIO M, et al: Elevated bioactive Prolactin levels in Systemic Lupus Erythematosus - Association with disease activity. **J Rheumatol** v.28, p.2216-21, 2001.
36. PACHECO, A. G.; CARDOSO, C. C.; MORAES, M. O. IFNG +874T/A, IL10-1082G/A and TNF -308G/A polymorphisms in association with tuberculosis susceptibility: a meta-analysis study. **Human Genetics**, v. 123, p. 477–84, 2008.
37. PRAVICA, V.; *et al.* A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- γ gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production. **Human Immunology**, v. 61, n. 9, p. 863-66, 2000
38. PETRI, Michelle et al. Combined Oral Contraceptives in Women with Systemic Lupus Erythematosus. **N Engl J Med**, v. 353, p.2550-2558, dez. 2005.
39. POLLARD, K M *et al.* Interferon- γ and Systemic Autoimmunity. **Discov Med**, California, USA, v. 87, n. 16, p.123-131, set. 2013.
40. PONS-ESTEL, G.J. *et al.* Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. **Semin Arthritis Rheum**. 2010; 39:257-268
41. RAHMAN A; ISENBERG D.A. Systemic lupus erythematosus. **N Engl J Med** v.358, p.929-939, 2008.
42. ROSEN, Mahoney J. A. Apoptosis and autoimmunity. **Curr Opin Immunol**. v.17 p.583-588, 2005.
43. RUS, V. *et al.*, The epidemiology of systemic lupus erythematosus. In: J, Wallace D; H, Hahn B. **Dubois lupus erythematosus**. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 34-44.
44. SATO, Emilia Inoue et al. Consenso brasileiro para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico (LES). **Rev Bras Reumatol**, v. 42, n. 6, p. 362-70, 2002.
45. SILVA, Helker Albuquerque Macedo da. **POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA EM GENES DE INTERLEUCINAS NO LÚPUS ERITEMATOSO**. 2014. 132 f. Tese (Doutorado) - Curso de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.
46. SILVA, Hildson Dornelas Angelo da et al. Interferon gamma and Interleukin 10 polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 4, p.2493-2500, 18 jan. 2014.

47. SINAI P. et al, C.T/B-cell interactions are more transient in response to weak stimuli in SLE-prone mice. **Eur. J. Immunol.** v.44, p. 3522–3531, 2014.
48. SOEMEDI, R. et al. Genetic Variation and RNA Binding Proteins: Tools and Techniques to Detect Functional Polymorphisms. **Systems Biology of RNA Binding Proteins**, v. 825, 2014.
49. SOUBHIA, Barbara Cury; MONTEIRO, Denise Leite Maia; MENDES, Bárbara Garcia. Anticoncepção na paciente com lúpus eritematoso sistêmico. **Femina**, São Paulo, v. 2, n. 43, p.77-82, abr. 2015.
50. TANGWATTANACHULEEPORN, Marut et al. Association of interferon-gamma gene polymorphism (+874A) with arthritis manifestation in SLE. **Clinical Rheumatology**, v. 26, n. 11, p.1921-1924, 23 ago. 2007. Springer Nature.
51. THEOFILOPOULOS, Argyrios N et al. The role of IFN-gamma in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. **Arthritis Res**, v. 3, n. 3, p.136-141, fev. 2001.
52. TISKIEVICZ, Fabiane. **Perfil hormonal, marcadores imunológicos e atividade da doença em mulheres com lúpus eritematoso sistêmico**. 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Endocrinologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Ufrgs, Porto Alegre, 2008.
53. TISKIEVICZ, Fabiane et al. Prolactina e macroprolactina no lúpus eritematoso sistêmico (LES). **Rev. Bras. Reumatol.**, São Paulo, v. 45, n. 3, p.191-194, jun. 2005.
54. VARELLA, Pedro P. V.; FORTE, Wilma C. Neves. Citocinas: revisão. **Rev Bras de Alergia e Imunopatologia**, v. 4, n. 24, p.1-4, ago. 2001.
55. VASUDEVAN, A. R.; GINZLER, E.M. Ed. Clinical Features of Systemic Lupus Erythematosus. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH. **Rheumatology**. St. Louis: Mosby Elsevier, p.1229-46, 5 ed. 2011
56. WASTOWSKI, Isabela J. et al. Patogenia das Doenças Auto-Imunes. In: VOLTARELLI, Júlio C. **Imunologia Clínica na Prática Médica**. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 3. p. 45-58.
57. ZANDMAN-GODDARD, Gisele; PEEVA, Elena; SHOENFELD, Yehuda. Gender and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 6, n. 6, p.366-372, jun. 2007.

58. ZANETTE, Vanilla Citadini et al. Lúpus eritematoso sistêmico e terapia de reposição hormonal: atualização. **Femina**, São Paulo, v. 6, n. 42, p.256-260, dez. 2014.

6 ARTIGO

Título: Polimorfismo genético do gene IFNG +874 A/T e associações com o prognóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico no Distrito Federal

Autores: Aline Ribeiro Barros¹, Carlos Eduino Lins², Luzitano Brandão Ferreira¹, Izabel Cristina R. da Silva¹,

Afiliações:

1. Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, Brazil;
2. Secretaria de Saúde do Distrito Federal, Brasília, DF, Brazil;
3. UniCEUB, Brasília, DF, Brazil.

***Autor Correspondente:**

Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Email: belbiomedica@gmail.com

Endereço: Centro Metropolitano, conjunto A, lote 01, Brasília - DF. CEP: 72220-275

Será submetido ao Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (ISSN 1676-2444)

RESUMO

O Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune que afeta o organismo de forma sistêmica, e pacientes acometidos com essa patologia tendem a ter níveis de citocinas elevados, dentre elas o interferon gama. Há relatos que polimorfismos do gene IFNG tenham participação na patogênese do LES e em suas manifestações clínicas, assim sendo o objetivo desse estudo consiste em associar o polimorfismo +874 IFNG A/T (rs2430561) e as manifestações clínicas em portadoras de LES atendidas em uma unidade hospitalar do Distrito Federal (Brasil). Para isto, uma estratégia PCR alelo específica foi conduzida para identificar a presença dos alelos A e T no íntron 1 em um estudo descritivo com 81 pacientes. Os estudos de associação com as características clínicas foram executados no programa SPSS versão 22.0. Notou-se que o genótipo TT, altamente produtor da citocina, estava presente em 16% das participantes, e foi considerado fator de risco para os critérios clínicos nefrite e de lesões orais e nasais ($P < 0,05$). Estes achados divergem de um estudo executado em coreanos, fazendo –se necessária, portanto, a existência de estudos complementares.

Palavras-chave: LES. Polimorfismo. IFNG

INTRODUÇÃO

As doenças autoimunes (DAI) são causadas pelo reconhecimento de antígenos próprios por linfócitos reativos que ativam uma cascata de reações levando as suas manifestações clínicas. Estudos demonstram que a origem das DAI é complexa e de origem multifatorial¹, dentre os fatores que se tornaram destaque nos últimos anos estão os genéticos. Alguns polimorfismos de genes específicos têm sido cada vez mais utilizados como ferramenta para identificação de predisposição para certas DAI.^{2,1}

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma DAI sistêmica de origem multifatorial. A doença progride com manifestações clínicas heterogêneas cursando com períodos de exacerbação e remissões dos sintomas^{3,4}, O LES é mais prevalente no sexo feminino (9:1), sendo mais frequente em mulheres em idade fértil.^{3,4,5}

Embora a etiologia do LES não esteja esclarecida, tem se observado que portadores da doença possuem um nível elevado de citocinas inflamatórias no seu organismo, o que resulta em funcionamento inadequado do sistema imune, com a deposição de imunocomplexos em nível tecidual e aumento nas taxas de apoptose e de ativação de células de defesa.⁶ Várias citocinas tem sido associadas ao LES, entre elas os interferons, que possuem níveis aumentados, especialmente nos períodos de exacerbação da doença.⁷ Estudos demonstram que o interferon gama pode estar envolvido em processos autoimunes sistêmicos como o LES.⁸

O interferon gama é uma citocina pró inflamatória produzida por linfócitos T e células NK. Ele participa da defesa contra vírus e patógenos externos e de reações inflamatórias, sendo codificado pelo gene *IFNG* que está localizado no braço curto do cromossomo 12, precisamente na posição 12q24.1.9

Apesar da existência de um papel desempenhado pelo interferon gama nas patologias autoimunes em especial no LES, os estudos envolvendo *IFNG* e LES são escassos.⁶

Nesse contexto, o presente estudo busca identificar se há evidência que estabeleça uma associação do gene IFNG com as manifestações clínicas do LES, para uma maior compreensão sobre polimorfismo do +874 IFNG A/T (rs2430561) e suas implicações na doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

Participantes da pesquisa

O estudo descritivo foi conduzido com 81 pacientes do sexo feminino com idades entre 40 e 76 anos. Estas portadoras de LES foram recrutadas em uma unidade hospitalar do Distrito Federal. As participantes selecionadas preencheram os critérios de classificação revisados e modificados pelo *American College of Rheumatology*^{10,11}.

As características clínicas de cada paciente com LES foram avaliadas cuidadosamente a partir dos respectivos prontuários. Comprometimento renal, perfil de auto-anticorpos, e ademais características clínicas também foram registradas. Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da FEPECS (ANEXO 1).

Extração de DNA

O DNA foi extraído de sangue periférico com uso do kit *Invisorb Spin Blood Mini Kit* (250) da empresa Invitex (catálogo #CA10-0005, lote #1031100300). A concentração de DNA foi determinada em corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio. O rendimento médio alcançado foi de 20 ng/μL.

PCR (Reação em cadeia de Polimerase) Qualitativo

O DNA diluído foi submetido à estratégia de PCR alelo específica para estudo da distribuição dos alelos na região +874 do intron 1 do gene *IFNG*. As sequências de oligonucleotídeos usadas foram: CP 5'-TCA ACA AAG CTG ATA CTC CA-3'; T : 5'-TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCT-3'; A: 5'-TTC TTA CAA CAC AAA ATC AAA TCA-3'. No termociclador, a temperatura inicial para desnaturação foi de 95°C por 5min, seguida de 35 ciclos de desnaturação à 95°C por 1min, anelamento à 60°C por 1min, extensão à 70°C por 2 min e uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%, com brometo de etídio na potência de 100W por 30 minutos, e sendo visualizados em um transluminador com fonte ultravioleta.

Análise Estatística

As frequências genotípicas dos pacientes foram descritas em termos de frequências absolutas e relativas (em porcentagem). Para associação das características clínicas para cada genótipo foi aplicado o teste qui-quadrado e o nível de significância adotado foi de 5%. Foi calculado o *Odds ratio* (OR) das frequências alélicas e genotípicas e utilizado intervalo de confiança (IC) de 95%. O programa estatístico utilizado foi o SPSS (versão 25.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

Conforme ilustrado na tabela 1, o genótipo TT foi observado em 16% (N=13) das portadoras de LES, e o estudo da associação entre o polimorfismo +874 IFNG A/T e o prognóstico, avaliado conforme os critérios ACR, resultou que o genótipo TT aparentemente diminui o risco para o critério hematológico, entretanto aumenta o

risco para nefrites e úlceras nasais e orais nas pacientes portadoras de LES (p <0,05).

Tabela 1: Distribuição da presença das manifestações clínicas em pacientes com LES conforme frequência genotípica do IFNG +874

		IFNG +874 A/T				P
		TT (N = 13; 16%)		TA+AA (N=68; 84%)		
		N	%	N	%	
ARTRITE NÃO EROSIVA – ACR	SIM	13	16,0%	68	84,0%	NA
	NÃO	0	0,0%	0	0,0%	
RASH MALAR – ACR	SIM	7	17,9%	32	82,1%	0,654
	NÃO	6	14,3%	36	85,7%	
LESÕES DISCOIDES – ACR	SIM	3	18,8%	13	81,3%	0,743
	NÃO	10	15,4%	55	84,6%	
FOTOSENSIBILIDADE – ACR	SIM	8	14,3%	48	85,7%	0,517
	NÃO	5	20,0%	20	80,0%	
SEROSITES – ACR	SIM	6	26,1%	17	73,9%	0,121
	NÃO	7	12,1%	51	87,9%	
NEFRITES – ACR	SIM	13	35,1%	24	64,9%	<0,01*
	NÃO	0	0,0%	44	100,0%	
HEMATOLÓGICO – ACR	SIM	9	12,3%	64	87,7%	0,006*
	NÃO	4	50,0%	4	50,0%	
ÚLCERAS ORAIS/NASAIS – ACR	SIM	5	38,5%	8	61,5%	0,016*
	NÃO	8	11,8%	60	88,2%	
FAN – ACR	SIM	13	16,0%	68	84,0%	NA
	NÃO	0	0,0%	0	0,0%	
ALTERAÇÃO IMUNOLÓGICA – ACR	SIM	10	21,3%	37	78,7%	0,132
	NÃO	3	8,8%	31	91,2%	
PSICOSE CONVULSÕES – ACR	SIM	0	0,0%	12	100,0%	0,101
	NÃO	13	18,8%	56	81,2%	

(Fonte: própria autora)

DISCUSSÃO

Polimorfismos genéticos podem ter impactos na susceptibilidade ao diversos agravos. Os tipos mais comuns de polimorfismos são os VNTRs (Número Variável

de Repetições em Tandem) e os SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos).^{6,12} Na literatura científica recente têm sido observados vários polimorfismos em regiões não codantes do gene *IFNG* associados ao LES.^{13,14,9,15}

Assim estas alterações genéticas podem afetar a expressão de interferon gama, e constituir um papel na patogênese do LES.¹⁶ O polimorfismo +874 *IFNG* A/T gera três possíveis genótipos A/A, T/A e T/T cada um relacionado com a produção de interferon gama: baixo, intermediário e alto produtor, respectivamente.⁹ Um estudo coreano exaustivo para determinar que polimorfismos do gene *IFNG* podem estar relacionados ao LES verificou que na região +874 *IFNG* A/T (rs2430561), o modelo recessivo TT (na população daquele estudo) está associado ao risco para LES, mas não ao seu prognóstico.¹⁶

No entanto, no presente estudo brasileiro três critérios ACR foram associados ao polimorfismo +874 *IFNG* A/T sendo que o genótipo TT foi considerado fator de risco para os critérios nefrites e úlceras nasais/orais.

A Nefrite Lúpica (NL) é uma complicação grave que pode levar a insuficiência renal aguda ou crônica¹⁷, a causa mais aceitável é que imunocomplexos formados através da mediação de linfócitos T e B se infiltram na membrana basal dos glomérulos dando início a uma glomérulonefrite¹⁷. Acredita-se que a lesão nos glomérulos seja mediada também pelo sistema complemento, entretanto ainda não existe biomarcadores confiáveis para NL.^{18,19} As vias de sinalização de interferons tipo 1 provocadas por infecções virais são semelhantes ao ambiente imunológico do LES, sabe-se que o interferon gama age de forma sinérgica com o interferon alfa, o que pode de alguma forma envolver essa citocina nos processos de NL.²⁰ Estima-se que cerca de há cerca de 50 polimorfismos genéticos, representam risco genético para LES, porém nenhum deles específico e NL.²⁰

As lesões orais no LES podem ser classificadas em agudas, subagudas e crônicas, sendo a última a manifestação mais comum. A lesão oral crônica é caracterizada por sua forma discoide e eritematosa podendo ser delimitada ou irregular, com superfície atrófica ou ulcerada.²¹ Acredita-se que as citocinas como o interferon gama tem um papel importante na gênese dessas lesões, uma vez que o desequilíbrio entre a resposta humoral e celular parece estar envolvido.²²

CONCLUSÃO

O polimorfismo 874 IFNG A/T (rs2430561) está associado ao prognóstico de LES em uma amostra brasileira. O genótipo TT parece ter uma relação com o aumento das lesões orais e nasais, além de estar associada também com a NL (manifestação clínica grave do LES) provavelmente por que esse genótipo possui um perfil de alto produtor de interferon gama, que é um citocina com alta atividade inflamatória.

O LES é uma patologia autoimune sistêmica grave com envolvimento de diversas citocinas na sua patogênese entre elas o interferon gama, entretanto os artigos acerca do tema são escassos e por vezes inconclusivos, o que evidencia a necessidade que os estudos de polimorfismos genéticos relacionados aos LES continuem para melhor elucidação dos mecanismos por trás dessa patologia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WASTOWSKI, Isabela J. et al. Patogenia das Doenças Auto-Imunes. In: VOLTARELLI, Júlio C. **Imunologia Clínica na Prática Médica**. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 3. p. 45-58
2. GOODNOW, C.C.; SPRENT, J.; GROTH, B.F.; VINUESA, C.G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. **Nature**, v. 435, p.590-7, 2005.
3. ABBAS, Abula; ASTER, Jon; KUMAR, V. **Robbins - Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 928 p.
4. BORBA, E. F. *et al.* I Consenso de Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Rev Bras Reumatol**, São Paulo, v. 48, n.4, p. 196-207, jul/ago, 2008
5. PONS-ESTEL, G.J. *et. al.* Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. **Semin Arthritis Rheum**. 2010; 39:257-268

6. SILVA, Hildson Dornelas Angelo da et al. Interferon gamma and Interleukin 10 polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 4, p.2493-2500, 18 jan. 2014
7. FONSECA, Samuel Barbosa. **LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO: CAUSAS, MECANISMOS PATOLÓGICOS E ALVOS TERAPÊUTICOS FUTUROS**. 2009. 14 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências Biológicas, Icbas-up, Universidade do Porto, Porto, 2009.
8. POLLARD, K M *et al.* Interferon- γ and Systemic Autoimmunity. **Discov Med**, California, USA, v. 87, n. 16, p.123-131, set. 2013.
9. HOLANDA, Marcelo Teixeira de. **Frequência dos Polimorfismos dos Genes de Interferon Gama (IFNG +874 T/A) e da Óxido Nítrico Sintase Induzida (NOS2A -954G/C) em uma Coorte de 313 Pacientes na Fase Crônica da Doença de Chagas e Associação com Presença e Gravidade de Cardiopatia**. 2013. 98 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.
10. TAN, Eng M. et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 25, n. 11, p. 1271-1277, 1982.
11. HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology Revised criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 40, n. 9, p. 1997, 1997.
12. SOEMEDI, R. et al. Genetic Variation and RNA Binding Proteins: Tools and Techniques to Detect Functional Polymorphisms. **Systems Biology of RNA Binding Proteins**, v. 825, 2014.

13. PRAVICA, V.; *et al.* A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN- γ gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN- γ production. **Human Immunology**, v. 61, n. 9, p. 863-66, 2000
14. CHONG, W. P., *et al.* The interferon gamma gene polymorphism +874 A/T is associated with severe acute respiratory syndrome. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, p. 1-4, 2006.
15. TANGWATTANACHULEEPORN, Marut *et al.* Association of interferon-gamma gene polymorphism (+874A) with arthritis manifestation in SLE. **Clinical Rheumatology**, v. 26, n. 11, p.1921-1924, 23 ago. 2007. Springer Nature.
16. KIM, K. *et al.* Interferon-gamma gene polymorphisms associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Annals Of The Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 6, p.1247-1250, 16 nov. 2009.
17. RAHMAN A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. **N Engl J Med** v.358, p.929-939, 2008.
18. CHUNG, S. A. *et al.* Lupus Nephritis Susceptibility Loci in Women with Systemic Lupus Erythematosus. **Journal Of The American Society Of Nephrology**, [s.l.], v. 25, n. 12, p.2859-2870, 12 jun. 2014. American Society of Nephrology.
19. CASTER, D. J. *et al.* ABIN1 Dysfunction as a Genetic Basis for Lupus Nephritis. **Journal Of The American Society Of Nephrology**, [s.l.], v. 24, n. 11, p.1743-1754, 22 ago. 2013. American Society of Nephrology.
20. KULKARNI, Onkar P.; ANDERS, Hans-joachim. Lupus nephritis. How latest insights into its pathogenesis promote novel therapies. **Current Opinion In**

Rheumatology, [s.l.], v. 24, n. 5, p.457-465, set. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

21. NICO MMS, et al. Oral lesions in lupus erythematosus: correlations with cutaneous lesions. **Eur J Dermatol**. v.18(4), p 376-381, 2008.
22. WERTH VP. Cutaneous Lupus insights into Pathogenesis and Disease Classification. **Bulletin of the NYU Hospital for Joit Diseases**. v. 65(3), p 200-204, 2007.

7 ANEXO I



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER Nº 309/2009

PROTOCOLO Nº DO PROJETO: 353/09 – POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Instituição Pesquisada: Secretaria de Saúde do Distrito Federal/SES-DF.

Área Temática Especial: Grupo III (não pertencente à área temática especial), Ciências da Saúde.

Validade do Parecer: 03/11/2011

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifesta-se pela **APROVAÇÃO DO PROJETO**.

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, inciso IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. **Ressaltamos a necessidade de encaminhar o relatório parcial e final, além de notificações de eventos adversos quando pertinentes.**

Brasília, 03 de novembro de 2009.

Atenciosamente,

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF
Coordenadora

Ângela Maria/CEP/SES-DF

Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - SES
Comitê de Ética em Pesquisa
Fone: 325-4955 - Fone/Fax: 326-0119 - e-mail: cepesdf@saude.df.gov.br
SMHN - Q. 501 - Bloco "A" - Brasília - DF - CEP.: 70.710-904

BRASÍLIA - PATRIMÔNIO CULTURAL DA HUMANIDADE

8 ANEXO II – Norma da revista “Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial”

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (JBPML), continuação do Jornal Brasileiro de Patologia, de periodicidade bimestral (fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro), é o órgão oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML), da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP) e da Sociedade Brasileira de Citopatologia (SBC). É indexado no Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), no Periodica e no Chemical Abstracts e é integrante da base de dados Scientific Electronic Library Online (SciELO). Destina-se à publicação de trabalhos científicos que contribuam para o desenvolvimento da área de Medicina Laboratorial e aceita as seguintes categorias: artigos originais, de revisão, de atualização, experimentais, relatos de caso, comunicações breves e cartas aos editores. Os trabalhos podem ser submetidos nos idiomas português, inglês ou espanhol, mas o texto completo será publicado apenas em inglês, com resumo em português ou espanhol.

ANÁLISE DOS TRABALHOS

O manuscrito recebido será enviado para, pelo menos, dois avaliadores independentes, pares científicos, de renome e com conhecimento específico na área contemplada pelo artigo. Após análise pelos avaliadores, o editor-chefe do JBPML entrará em contato com o autor principal comunicando os passos a serem seguidos na aceitação do trabalho para publicação ou sua eventual rejeição.

ÉTICA

Estudos realizados com seres humanos, incluindo órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Quando pertinente, o trabalho deverá ter aprovação do comitê de ética da instituição onde foi realizada a pesquisa, em consonância com a Declaração de Helsinki, atualizada em 2008. Nos trabalhos experimentais envolvendo animais, devem ser respeitados os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as normas estabelecidas no Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, Washington, D.C., atualizada em 2011). As drogas e substâncias químicas eventualmente utilizadas na realização do trabalho devem ser identificadas com precisão. Não devem ser utilizados nomes ou iniciais do paciente nem informados nomes comerciais, de empresas e/ou registros de hospitais.

RESPONSABILIDADE DA AUTORIA E CONFLITO DE INTERESSES

De acordo com as diretrizes elaboradas pelo International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), atualizada em 2013, a autoria deve ser validada para: a) concepção e projeto do trabalho ou aquisição, análise e interpretação dos dados; b) redação inicial do artigo ou revisão crítica do seu conteúdo; c) aprovação final da versão para publicação; d) responsabilidade para todos os aspectos do trabalho, garantindo que questões relacionadas à acurácia ou integridade de qualquer parte do

trabalho sejam adequadamente investigadas e analisadas. Todos os autores listados no artigo devem preencher os quatro critérios de validação de autoria para serem designados como tal. Os participantes do trabalho que não preencherem os quatro critérios devem ser incluídos na seção de Agradecimentos (Acknowledgements). O autor principal deve especificar a contribuição de cada um nas diferentes etapas do estudo.

Do mesmo modo, o autor principal deve declarar ou negar a existência de possíveis conflitos de interesse. Caso exista algum conflito, ele deve ser especificado como nota no final do artigo.

RESUMOS E UNITERMOS

Independentemente do idioma no qual o trabalho foi escrito, devem constar dois resumos: um em português (Resumo) e outro em inglês (Abstract). Os resumos devem identificar os objetivos, os procedimentos e as conclusões do trabalho (máximo de 250 palavras para artigos originais, artigos de revisão e artigos de atualização; e máximo de 100 palavras para relatos de caso e comunicações breves). Caso o trabalho tenha sido escrito em espanhol, deverá haver um resumo também nesse idioma.

Os unitermos, palavras que representam o assunto tratado no trabalho, devem ser em número de três a seis, utilizando o vocabulário controlado Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da BIREME, acrescidos de outros termos, quando necessário. Devem ser apresentados em português e inglês. Caso o trabalho tenha sido escrito em espanhol, deverá haver descritores também nesse idioma.

AGRADECIMENTOS

Devem ser breves, diretos e dirigidos apenas à pessoa ou à instituição que contribuiu substancialmente para a elaboração do trabalho. Devem ser incluídos após as conclusões e antes das referências bibliográficas.

ESTRUTURA DO TEXTO

Artigos originais

São contribuições destinadas a divulgar resultados de pesquisa original que possam ser replicados. Os artigos podem conter até 4 mil palavras. A sua estrutura formal deve seguir o esquema de apresentação do texto para esse tipo de artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.

O uso de subtítulos é recomendado, particularmente na Discussão. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser claramente apontadas. Sugere-se o detalhamento do tópico Material e Método. Para esses artigos, exige-se a apresentação de resumos estruturados em português e inglês, com cabeçalhos obedecendo à apresentação formal do artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências. O Abstract (resumo em inglês) deve ser precedido pelo título em inglês. As referências bibliográficas devem aparecer no final do texto, obedecendo às normas especificadas a seguir

Comunicações breves

São relatos curtos que devem apresentar: 1) dados de estudos preliminares com achados sugestivos que garantam uma investigação mais definitiva; 2) estudos de

replicação; e 3) estudos negativos de tópicos importantes. Esses artigos devem ter até 1.500 palavras, incluir resumo não estruturado e, no máximo, uma tabela ou figura, além das referências bibliográficas.

Artigos de revisão

Serão aceitos apenas mediante convite.

Avaliações críticas sistematizadas da literatura sobre determinado assunto, devem incluir conclusões e ter até 5 mil palavras. A organização do texto, com exceção de Introdução, Discussão e Conclusão, fica a critério do autor. Para esses artigos, exige-se um resumo estruturado no idioma do texto e outro em inglês. Uma lista extensa de referências bibliográficas deve aparecer no final do texto.

Relatos de caso

São trabalhos de observações clinicolaboratoriais originais, acompanhados de análise e discussão. Devem conter até 1.500 palavras. A estrutura deve apresentar, no mínimo, os seguintes tópicos: Introdução, Relato(s) dos(s) caso(s) e Discussão. Incluir um resumo não estruturado no idioma do texto e outro em inglês.

Cartas aos editores

Inclui cartas que visam a discutir artigos recentes publicados na revista ou a relatar pesquisas originais ou achados científicos significativos. Cartas breves, com no máximo 500 palavras (incluindo referências, sem tabelas ou figuras), serão consideradas se estiver explícita a frase "para publicação".

REFERÊNCIAS

As referências bibliográficas devem aparecer no final do artigo, e ser numeradas sucessivamente pela ordem em que são mencionadas pela primeira vez no texto. Devem seguir as normas do Estilo Vancouver. Os títulos dos periódicos deverão ser referidos na forma abreviada de acordo com o Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus). Se a lista de referências não seguir a norma adotada, os trabalhos serão imediatamente rejeitados, sem revisão de conteúdo.

Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados, quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências bibliográficas; apenas mencionados no texto ou em nota de rodapé. A lista de referências deve seguir o estilo dos exemplos abaixo.

Exemplos:

- **Artigos de periódicos (um só autor)**
Fry PH. O significado da anemia falciforme no contexto da 'política racial' do governo brasileiro 1995-2004. *Hist Cienc Saude Manguinhos*. 2005; 12: 347-70. PubMed PMID: 16353330.
- **Artigos de periódicos (até seis autores)**
Barbosa AJA, Queiroz DM, Mendes EN, Rocha GA, Lima GF Jr, Oliveira CA. Immunocytochemical identification of *Campylobacter pylori* in gastritis and correlation with culture. *Arch Pathol Lab Med*. 1988 May; 112(5): 523-5. PubMed PMID: 3282485.

- **Artigos de periódicos (mais de seis autores)**
Rocha GA, Queiroz DM, Mendes EN, et al. Indirect immunofluorescence determination of the frequency of anti-H. pylori antibodies in Brazilian blood donors. Braz J Med Biol Res. 1992; 25(7): 683-9. PubMed PMID: 1342599.
- **Artigo de periódico on-line**
Polgreen PM, Diekema DJ, Vandenberg J, et al. Risk factors for groin wound infection after femoral artery catheterization: a case-control study. Infect Control Hosp Epidemiol [Internet]. 2006 Jan; 27(1): 34-7. Disponível em: <http://www.journals.uchicago.edu/ICHE/journal/issues/v27n1/2004069/2004069.web.pdf>.
- **Livros no todo (dois autores)**
Eyre HJ, Lange DP. Informed decisions: the complete book of cancer diagnosis, treatment, and recovery. 2nd ed. Atlanta: American Cancer Society; 2002.
- **Capítulos ou parte de livro editado por outro autor**
Mendeenhall WM. Treatment of head and neck cancer. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. Cancer: principles and practice of oncology. 9th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p. 729-80.
- **Parte de livro em meio eletrônico**
São Paulo (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente. In: São Paulo (Estado). Entendendo o meio ambiente. São Paulo; 1999. v. 1. Disponível em: <http://www.bdt.org/sma/entendendo/atual/htm>.
- **Evento em meio eletrônico**
Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editores. Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.
- **Tese ou dissertação**
Silva MAL. Estudo da identificação de haplótipos e a relação com as manifestações clínicas em pacientes com doença falciforme. 2008. [dissertação]. Programa de pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
- **Citações no texto**
Devem ser identificadas por algarismos arábicos (números-índice). Podem também ser acrescentados o nome do autor e o ano. As referências com mais de um autor devem conter o sobrenome do autor seguido da expressão et al., como, por exemplo, Higashi et al.

Tabelas e figuras

As tabelas deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas por seu título, recomendando-se a não repetição dos mesmos dados em gráficos. Na montagem das tabelas, seguir as normas de apresentação tabular estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística e publicadas pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1993).

As ilustrações (gráficos, fotografias, desenhos etc.) deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras. Devem ser suficientemente claras para permitir sua produção. Os gráficos deverão vir preparados em programa processador de gráficos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto onde as ilustrações serão intercaladas como figuras.

O GNPapers aceita a importação de tabelas, imagens e gráficos em arquivo eletrônico nos seguintes formatos: jpg, gif, psd, tif e png, e com resolução de no mínimo 300 dpi.

O direito à privacidade do paciente não deve ser infringido. Imagens que eventualmente permitam a identificação pessoal somente poderão ser utilizadas com consentimento por escrito do paciente ou responsável, quando da submissão do manuscrito

Abreviações e nomes de medicamentos

As abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. Empregar o nome genérico de medicamentos e indicar a fonte de componentes não disponíveis para prescrição.

As unidades de medida, inclusive suas abreviaturas, devem ser expressas no sistema métrico decimal e, quando o autor assim o desejar, também no Sistema Internacional (SI) entre parênteses.

Contato com a secretaria do JBPML

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial
Tel.: +55 (21) 3077-1400
e-mail: jbpml@sbpc.org.br

Indexadores

