

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

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DA REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA DO  
GENE *HLA-G* E INSERÇÃO *ALU<sub>Y</sub>HG* COM A MANIFESTAÇÃO DO LÚPUS  
ERITEMATOSO SISTÊMICO NA POPULAÇÃO DO ESTADO DE SANTA  
CATARINA**

**GABRIELA DUARTE KARASIAK**

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Yara Costa Netto Muniz  
Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Ilíada Rainha de Souza

FLORIANÓPOLIS  
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Karasiak, Gabriela Duarte

ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DA REGIÃO 3' NÃO  
TRADUZIDA DO GENE HLA-G E INSERÇÃO ALUYHG COM A  
MANIFESTAÇÃO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO NA  
POPULAÇÃO DO ESTADO DE SANTA CATARINA [tcc] / Gabriela  
Duarte Karasiak ; orientadora, Yara Costa Netto Muniz  
; co-orientadora, Iliada Rainha de Souza. -  
Florianópolis, SC, 2012.

98 p. ; 21cm

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de  
Ciências Biológicas. Curso de Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Genética. 2. Polimorfismos genéticos. 3. HLA-G.  
4. AluyHG. 5. Lúpus Eritematoso Sistêmico. I. Muniz,  
Yara Costa Netto. II. Souza, Iliada Rainha de. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em  
Ciências Biológicas. IV. Título.

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

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DA REGIÃO 3' NÃO TRADUZIDA DO  
GENE *HLA-G* E INSERÇÃO *ALU*YHG COM A MANIFESTAÇÃO DO LÚPUS  
ERITEMATOSO SISTÊMICO NA POPULAÇÃO DO ESTADO DE SANTA  
CATARINA**

**GABRIELA DUARTE KARASIAK**

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

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Yara Costa Netto Muniz  
Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Ilíada Rainha de Souza

FLORIANÓPOLIS  
2012



## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, onde realizei minha graduação em Ciências Biológicas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo a Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC), órgãos financiadores que possibilitaram a realização de nossos projetos de pesquisa.

Aos pacientes, que cederam seu tempo, paciência e coragem para poder nos ajudar nessa pesquisa.

Aos funcionários e instituições que colaboraram com essa pesquisa, principalmente ao Dr. Ivânio Alves Pereira e à Dra. Adriana Fontes Zimmermann, médicos do Hospital Universitário, pela paciência e cooperação nesses últimos anos, sempre nos ajudando o contato com os pacientes.

À minha orientadora, Yara Costa Netto Muniz, por ser sempre muito atenciosa e estar disposta a ajudar, pela sua paciência infinita, amizade e ensinamento profissional.

À Prof<sup>a</sup> Ilíada Rainha de Souza, por me acolher no seu laboratório, com seu jeito de “mãezona” e seus conselhos que se estendem para muito além do laboratório.

À Dr. Andrea Rita Marrero, por seus ensinamentos e muitas histórias que alegraram nossas tardes com risadas.

Aos membros da banca, por gentilmente aceitarem o convite para integrar esta banca e garantirem valiosas contribuições ao meu trabalho.

Aos professores da graduação, por servirem de exemplo e sem os quais eu não estaria aqui hoje.

Aos “lapogeanos”, pela colaboração e sem os quais eu não teria conseguido realizar esse trabalho. À Msc. Mariáh, por deixar nossos dias mais alegres. À Msc. Ticiania, por sempre estar disposta a ajudar com todo o seu conhecimento. À Msc. Bibiana, por sempre estar perto e disposta a ajudar. Ao mestrando Guilherme, por seus conhecimentos de inglês e histórias para Andrea contar.

Às minhas colegas de TCC, Amanda e Leili, pela companhia e amizade por todos esses anos de graduação, pelas horas dentro e fora do laboratório, por me aturarem tanto tempo e me ajudarem a crescer como pessoa.

Aos meus amigos de “2008.2”, Mille, Chê, Bidu, May, Laís, Rafa (que está no Canadá) e tantos outros que fiz durante o curso, com os quais vivi muitas histórias, dei muitas risadas, que fizeram as saídas de campo ficarem interessantes, as provas mais fáceis de estudar, as aulas chatas passarem mais rápido.

Ao meu namorado, Hugo Kubo, por ser tão compreensivo, atencioso e me apoiar nos meus projetos para o futuro. Te amo<sup>3</sup>.

À minha família, pela compreensão e apoio, por não se queixar quando ia para casa “apenas para dormir” (e deixava minha Mãe sem dormir), por me buscarem quando passava da hora na universidade (não é Pai?), por todo o suporte que me deram desde sempre, me criando com toda a base moral que uma pessoa honesta e decente precisa ter, me dando todo o amor e carinho. Sem vocês eu não seria nada, amo muito todos!

**Sozinhos não chegamos a lugar nenhum...**





## RESUMO

KARASIAK, G. D. Análise dos polimorfismos da região 3' não traduzida do gene HLA-G e inserção *Alu**YHG* com a manifestação do lúpus eritematoso sistêmico na população do estado de Santa Catarina. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis/SC, 2012.

O lúpus eritematoso sistêmico é uma doença inflamatória crônica de caráter autoimune, multissistêmica, remittente e recidivante, sendo caracterizada por causar a produção e deposição de autoanticorpos, e a infiltração de células inflamatórias causa dano a alguns órgãos. A origem da doença é desconhecida, mas acredita-se que uma combinação da genética, fatores ambientais, hormônios e cromossomos sexuais estejam envolvidos. O *HLA-G* está relacionado com a inibição de células do sistema imune, como células T e NK, conferindo proteção contra respostas inflamatórias. Entre os polimorfismos ligados a sua expressão está a inserção ou deleção de 14pb localizado na 3'UTR. A família Alu é o elemento móvel mais comum em genomas de primatas, com mais de 1,1 milhões de cópias no *Homo sapiens*. A inserção *Alu**YHG* encontra-se entre os loci *HLA-A* e *HLA-G*, podendo ser um marcador da região. A partir disso, o objetivo desse estudo foi genotipar 153 pacientes e 153 controles (pareados por idade e sexo) e verificar a influência desses polimorfismos na manifestação da doença. Para isso, foi realizado um levantamento de dados epidemiológicos relacionados à manifestação da doença (hábito tabagista, histórico familiar e idade de manifestação da doença) e estes foram testados. O DNA foi extraído de sangue total e a genotipagem feita por PCR e visualizada em eletroforese em gel vertical de poliacrilamida em concentração de 7% corado com nitrato de prata, no caso do polimorfismo do *HLA-G*, e em gel de agarose 1%, no caso do polimorfismo *Alu**YHG* (com 322pb). Foram realizados cálculos das frequências alélicas e genotípicas, análises de associações e inferência de haplótipos. Após as análises foram encontrados valores significativos de associação dos polimorfismos e a manifestação de LES para os genótipos *14pb\*Del\*Del* (OR=0,589,  $p=0,046$ ), *322pb\*Del\*Del* (OR=1,653,  $p=0,039$ ). Para os dados epidemiológicos, foram encontradas associação para fumantes (OR=2,637,  $p=0,009$ ) e proteção para nunca fumantes (OR=0,545,  $p=0,047$ ). Também houve valor significativo entre o grupo nunca fumantes e o genótipo *14pb\*Del\*Del* (OR=0,475,  $p=0,043$ ). Considerando os haplótipos inferidos, os valores significativos

encontrados foram *14pb\*In/322pb\*In* (OR=0,198,  $p=0,048$ ), *14pb\*Del/322pb\*In* (OR=0,509,  $p=0,018$ ), *14pb\*In/322pb\*Del* (OR=1,725,  $p=0,008$ ), assim como para a composição haplotípica *14pb\*Del\*Del/322pb\*Del\*In* (OR=0,309,  $p=0,003$ ). Nas associações entre haplótipos e dados epidemiológicos, foram encontradas associações positiva entre nunca fumantes e o haplótipo *14pb\*In/322pb\*Del* (OR=2,186,  $p=0,006$ ), entre histórico familiar e as composições haplotípicas *14pb\*Del\*Del/322pb\*Del\*Del* (OR=6,465,  $p=0,002$ ) indicando risco para a manifestação da doença, e associação negativa para *14pb\*Del\*In/322pb\*Del\*In* (OR=0,221,  $p=0,010$ ). A idade de manifestação da doença antes dos 16 anos apontou risco quando com o haplótipo *14pb\*Del/322pb\*In* (OR=4,308,  $p=0,013$ ) e proteção na manifestação entre 16 e 50 anos quando com o haplótipo *14pb\*Del/322pb\*In* (OR=0,309,  $p=0,023$ ). Em conclusão, os polimorfismos da 3'UTR do *HLA-G* são associados à doença bem como aos dados epidemiológicos analisados neste trabalho e a inserção *AluYHG* encontra-se em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo do *HLA-G* aqui analisado, podendo ser um marcador da região cromossômica.

Palavras chave: Lúpus Eritematoso Sistêmico. HLA-G. *AluYHG*. Doença autoimune. Estudo de associação. Genética epidemiológica.

## ABSTRACT

KARASIAK, G. D. Analysis of polymorphisms of the 3' untranslated region of *HLA-G* gene and insertion *Alu**YG* with the manifestation of systemic lupus erythematosus in the population of the state of Santa Catarina. Final Paper – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis / SC, 2012.

Systemic lupus erythematosus is a chronic inflammatory disease of character autoimmune, multisystem, remitting and relapsing, characterized by causing the production of autoantibodies and deposition, and infiltration of inflammatory cells cause damage to some organs. The origin of the disease is unknown but it is believed that a combination of genetics, environmental factors, hormones and sex chromosomes are involved. *HLA-G* is associated with inhibition of immune system cells, such as NK and T cells, conferring protection against inflammatory responses. Among polymorphisms linked to its expression is insertion or deletion of 14pb located in the 3'UTR. The *Alu* family is the most common mobile element in primate genomes, with more than 1.1 million copies in *Homo sapiens*. The insertion *Alu**YG* located between the loci *HLA-A* and *HLA-G*, may be a marker region. From this, the objective of this study was to genotype 153 patients and 153 controls (matched for age and sex) and the influence of these polymorphisms in the demonstration and development of the disease. For this, a survey was conducted of epidemiological data related to the development of the disease (smoking habits, family history and age of onset of the disease) and these were tested. DNA was extracted from whole blood by PCR and genotyping made and viewed in vertical gel electrophoresis in polyacrylamide concentration of 7% stained with silver nitrate in the case of polymorphism of *HLA-G*, and 1% agarose gel in *Alu**YG* case polymorphism (with 322pb). Calculations were made of the allele and genotype frequencies, analyzes of associations and haplotype inference. The analysis found associations of the polymorphisms and the risk of developing SLE or protection for genotypes *\*14pb\*DelDel* (OR = 0.589, p = 0.046), *\*322pb\*DelDel* (OR = 1.653, p = 0.039). For epidemiological data, we found an association for smokers (OR = 2.637, p = 0.009) and protection for never smokers (OR = 0.545, p = 0.047). There was also significant values among the never smokers group and genotype *\*14pb\*DelDel* (OR = 0.475, p = 0.043). Considering the inferred haplotypes, significant values were in *14pb\*In/322pb\*In* (OR = 0.198, p = 0.048), *14pb\*Del/322pb\*In* (OR =

0.509,  $p = 0.018$ ), *14pb\*In/322pb\*Del* (OR = 1.725,  $p = 0.008$ ) and for composing haplotype *14pb\*Del\*Del/322pb\*Del\*In* (OR = 0.309,  $p = 0.003$ ). In the associations between haplotypes and epidemiological data, associations were found between risk of never smokers and haplotype *\*14pbIn/322pb\*Del* (OR = 2.186,  $p = 0.006$ ), between family history and compositions haplotype *14pb\*Del\*Del/322pb\*Del\*Del* (OR = 6.465,  $p = 0.002$ ) indicating risk and protection for *14pb\*Del\*In/322pb\*Del\*In* (OR = 0.221,  $p = 0.010$ ). The age of disease onset before age 16 was associated with the risk haplotype *\*14pbDel/322pb\*In* (OR = 4.308,  $p = 0.013$ ) and protection on manifestation between 16 and 50 years with haplotype *\*14pbDel/322pb\*In* (OR = 0.309,  $p = 0.023$ ). In conclusion, the polymorphisms of *HLA-G* 3'UTR are associated with the disease as well as the epidemiological data analyzed in this study and insertion *AluHG* is in linkage disequilibrium with the polymorphism of *HLA-G* analyzed here and may be a marker of chromosomal region.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus. *HLA-G*. *AluHG*. Autoimmune Disease. Association Study. Genetic epidemiology.

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Critérios do <i>American College of Rheumatology</i> para o diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico .....	23
<b>Tabela 2.</b> Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a PCR.....	41
<b>Tabela 3.</b> Classificação da amostra, de acordo com gênero e idade, entre pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico.(casos) e indivíduos sem diagnóstico e casos na família (controles). .....	49
<b>Tabela 4.</b> Frequências alélicas e genotípicas para casos e controles, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e a manifestação de lúpus eritematoso sistêmico, valores de p e intervalo de confiança (IC, 95%). .....	51
<b>Tabela 5.</b> Frequências alélicas e genotípicas para casos e controles, cálculos de associação (OR) entre o histórico familiar e a manifestação de lúpus eritematoso sistêmico, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e p.....	53
<b>Tabela 6.</b> Frequências de fumantes, ex-fumantes e nunca fumantes para casos e controles, cálculos de associação (OR) entre o hábito tabagista e a manifestação de lúpus eritematoso sistêmico, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e p.....	54
<b>Tabela 7.</b> Frequências alélicas e genotípicas para casos e controles, cálculos de associação (OR) entre o hábito tabagista e a manifestação de lúpus eritematoso sistêmico, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e p. ....	55
<b>Tabela 8.</b> Frequências alélicas e genotípicas para casos e controles, cálculos de associação (OR) entre a idade de manifestação da doença e a manifestação de lúpus eritematoso sistêmico, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e p.....	56
<b>Tabela 9.</b> Haplótipos considerando os polimorfismos 14pb In/Del da 3'UTR do HLA-G e 322pb In/Del da inserção <i>Alu<sub>y</sub>HG</i> , para as populações de casos e controles, cálculos de associação (OR) entre os haplótipos e a manifestação de lúpus eritematosos sistêmico, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e p. ....	61



## Lista de Figuras

- Figura 1.** Mecanismo de cronicidade de doenças autoimunes: após a ativação de linfócitos autorreativos, promovido pelos mecanismos de amplificação, a liberação de antígenos próprios dos tecidos danificados leva a expansão de epítomos. **Fonte: Abbas, 7ª edição, 2011**..... 22
- Figura 2.** A localização da região do MHC humano (HLA) no cromossomo 6, a disposição dos genes dentro das classes II, III e I e em amarelo destaque para o locus HLA-G (adaptado de Cambridge Journals, 2012) ..... 26
- Figura 3.** Estrutura do gene *HLA-G* e sua expressão. O mRNA primário e seus seis processamentos de mRNAs possíveis estão ilustrados, assim como a identificação dos éxons presentes e a localização de códon de parada. São geradas sete isoformas proteicas por processamento alternativo, sendo quatro aderidas à membrana e três solúveis. **Fonte: Donadi et al., 2011.** ..... 27
- Figura 4.** Sítios de variações da 3'UTR do gene HLA-G. Em negrito os polimorfismos observados na região 3' não traduzida do HLA-G, que podem influenciar a expressão do gene Modificado de: Donadi et al., 2011 ..... 29
- Figura 5.** Localização do *AluyHG* no bloco de MHC: (A) é um mapa do local e da distribuição da classe I de HLA de codificação e de não codificação de genes, incluindo os HLA-A; (B) é o mapa da localização do sítio de inserção *AluyHG* relativamente aos loci HLA-H e-G; (C) A sequência *AluyHG* é representado pela caixa que é flanqueada por sequências de repetição directa (sublinhada). **Adaptado de: Kulski et al., 2001.** ..... 33
- Figura 6 -** Gel de poliacrilamida a 7%, corado com nitrato de prata. Fragmentos de DNA de dois diferentes tamanhos, 345pb (Inserção 14pb) e 359pb (deleção 14pb), podem ser observados após corrida eletroforética de 3horas, a 160 V. O gel digitalizado ilustra uma inserção (raia1), uma deleção (raia 2), uma inserção ; deleção (raia 3). ..... 43
- Figura 7 -** Gel de agarose a 1%, na presença do corante fluorescente *GelRed™*. Podem-se visualizar fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, 218pb (presença da inserção *AluyHG*)e 540pb (ausência da inserção *AluyHG*), após corrida eletroforética de 30minutos, a 90V. O gel digitalizado ilustra a presença de uma deleção (raia 1), uma inserção(raia 2) e uma inserção / deleção (raia 3). ..... 45





## Lista de Abreviaturas

APC	Célula Apresentadora de Antígeno (do inglês, <i>antigen-presenting cell</i> )
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DEL	Deleção
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i> )
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético (do inglês, <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
g	Força centrípeta
HLA	Complexo de Histocompatibilidade Humano (do inglês, <i>human leukocyte antigen</i> )
HU	Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
IN	Inserção
LAPOGE	Laboratório de Polimorfismos Genéticos
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LINE	Elementos longos intercalados (do inglês, <i>long interspersed elements</i> )
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i> )
MEI	Inserção de elementos móveis (do inglês, <i>mobile element insertions</i> )
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, <i>major histocompatibility complex</i> )
mRNA	RNA mensageiro
NK	Células <i>Natural Killer</i>
n	Número amostral
OR	Razão de Chance (do inglês, <i>odds ratio</i> )
<i>p</i>	Valor de <i>p</i>
pb	Pares de Base
QSP	Quantidade Suficiente Para
rpm	Rotações Por Minuto
SBR	Sociedade Brasileira de Reumatologia
SINE	Elementos curtos intercalados (do inglês, <i>short interspersed elements</i> )

UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
URR	Região reguladora a montante (do inglês, <i>upper regulatory region</i> )
UTR	Região não traduzida (do inglês, <i>untranslated region</i> )
UV	Ultravioleta
V	Volts
WL	Luz Branca (do inglês, <i>white light</i> )

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1 LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO .....	22
<b>1.1.1 Epidemiologia</b> .....	24
1.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE ..	25
<b>1.2.1 HLA-G</b> .....	27
<b>1.2.2 HLA e LES</b> .....	30
1.3 INSERÇÃO <i>Alu</i> <i>YG</i> .....	31
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	35
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	37
3.1 OBJETIVO GERAL .....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	39
4.1 COLETA .....	39
4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS .....	40
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO .....	40
<b>4.3.1 Reagentes e Soluções</b> .....	40
4.4 GENOTIPAGEM.....	41
<b>4.4.1 PCR</b> .....	41
<b>4.4.2 Genotipagem <i>HLA-G</i> 14pb</b> .....	42
4.4.2.2 Procedimento.....	42
4.4.2.3 Leitura dos resultados no gel .....	42
4.4.2.4 Coloração com Nitrato de Prata .....	43
4.4.2.4.1 <i>Reagentes e Soluções</i> .....	43
4.4.2.4.2 <i>Procedimento</i> .....	43
<b>4.4.3 Genotipagem <i>AluYG</i></b> .....	44
4.4.3.1 Reagentes e Soluções .....	44
4.4.3.2 Procedimento.....	45
4.4.3.3 Leitura dos resultados no gel .....	45
4.5 ANÁLISE E TRATAMENTO DE DADOS .....	46
<b>4.5.1 Homogeneidade da amostra</b> .....	46
<b>4.5.2 Dados Epidemiológicos</b> .....	46
<b>4.5.3 Estimativas das Frequências alélicas e Genotípicas</b> .....	46
<b>4.5.4 Genótipos e análise de associação</b> .....	46
<b>4.5.5 Determinação dos haplótipos</b> .....	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	49
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	49
5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	49
<b>5.2.1 Equilíbrio De Hardy-Weinberg</b> .....	49

<b>5.2.2</b>	<b>Frequências Alélicas, Genóticas e Análises de Associação</b>	50
<b>5.2.3</b>	<b>Desequilíbrio de Ligação</b>	59
<b>5.2.4</b>	<b>Inferência de Haplótipos</b>	60
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	71
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	73
<b>ANEXO A</b>		83
<b>ANEXO B</b>		85
<b>ANEXO C</b>		87
<b>ANEXO D</b>		94

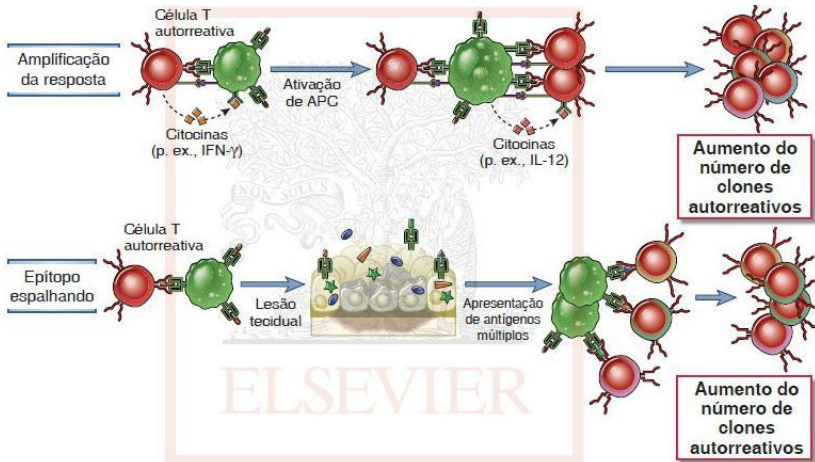
## 1. INTRODUÇÃO

As doenças de etiologia complexa resultam da combinação de vários fatores, como genéticos, ambientais, comportamentais, imunológicos entre outros. Doenças autoimunes, distúrbios neurológicos e neurodegenerativos e doenças como hipertensão, diabetes, obesidade e câncer fazem parte desse grupo de doenças complexas (Back, 2007). Nestas doenças, a presença de um determinado alelo não é condição suficiente nem essencial para o estabelecimento do fenótipo portador da doença, contudo, o alelo pode fornecer ao portador uma susceptibilidade genética que, em combinação a um conjunto de fatores exógenos, como idade, sexo, exposição ambiental e hormonal, atuação do seu sistema imunológico, entre outros, são considerados importantes na manifestação das doenças complexas (Braun-Prado, 2006).

A função fisiológica do sistema imune é manter a homeostase do organismo com o ambiente, criando defesas contra micro-organismos infecciosos. Quando o sistema falha, até mesmo substâncias estranhas não infecciosas podem causar respostas imunológicas, independentemente das consequências fisiológicas ou patológicas dessa reação. Considerando isso, em algumas situações, até mesmo moléculas próprias poderiam desenvolver uma resposta imunológica, desencadeando uma resposta autoimune (Abbas *et al.*, 2011).

A tolerância imunológica é definida como a ausência de resposta do sistema imune a um antígeno, causada pela exposição prévia a este antígeno. A autoimunidade resulta de uma falha dos mecanismos de autotolerância em células T ou B, o que pode levar a um desequilíbrio entre a ativação de linfócitos e os mecanismos de controle. A seleção negativa de linfócitos autorreativos previne a maturação de alguns linfócitos específicos para antígenos próprios, e quando esses chegam a maturar, esses sofrem eliminação por inativação ou deleção. A perda da autotolerância ocorre quando os linfócitos autorreativos não sofrem inativação, deleção ou seleção, ativando células apresentadoras de antígeno (APC) de modo que os antígenos próprios são apresentados de forma imunogênica ao sistema imune. Após a ativação dos linfócitos autorreativos, muitos mecanismos de amplificação perpetuam a resposta iniciada contra um antígeno próprio, além de que a lesão nos tecidos pode ativar outros linfócitos contra novos epítomos próprios, exacerbando a doença. Este fenômeno é chamado de “expansão clonal dos epítomos”, e pode explicar por que uma doença autoimune se

desenvolve e tende a ser crônica e progressiva (Figura 1) (Abbas *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Mecanismo de cronicidade de doenças autoimunes: após a ativação de linfócitos autorreativos, promovido pelos mecanismos de amplificação, a liberação de antígenos próprios dos tecidos danificados leva a expansão de epítipos.

**Fonte:** Abbas, 7ª edição, 2011.

### 1.1 LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) foi assim nomeado em 1851, por Pierre Cazenave, mas sabe-se que a doença existe desde muito antes dessa data. A palavra *lupus* tem sua origem no latim, tendo o significado livre e literal de “lobo”. Acredita-se que o nome tenha se originado das lesões faciais que alguns pacientes podem apresentar, lembrando as feridas que um lobo pode fazer ao devorar a carne. Apesar de ser um tanto fantasioso, é comum se utilizar esse termo (lobo, ou *wolf* em inglês) para representar a doença (Isenberg & Manzi, 2008).

O LES é uma doença inflamatória crônica de caráter autoimune, multissistêmica, remittente e recidivante, sendo caracterizada por causar a produção e deposição de autoanticorpos, e a infiltração de células inflamatórias causa dano a órgãos alvo, como rins, pele e cérebro (Abbas *et al.*, 2011; Bernknopf *et al.*, 2012; Moulton & Tsokos, 2012). A origem da doença é desconhecida, mas acredita-se que uma

combinação da genética (hereditariedade), fatores ambientais (radiação ultravioleta e alguns medicamentos), e hormônios estejam envolvidos (Miah *et al.*, 2008; Moulton & Tsokos, 2012; Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR), 2011).

Usualmente o diagnóstico para a doença é feito baseado nos critérios estabelecidos pelo *American College of Rheumatology* (Tan *et al.*, 1982), onde é preciso observar pelo menos quatro dos onze critérios para diagnóstico formal da doença (Tabela 1) (Tsokos, 2011). Estes critérios substituíram os definidos em 1971, pois incluíram avanços nos testes diagnósticos e marcadores para doença, como detecção de anticorpos antinucleares e anti-DNA e outros testes sorológicos e imunopatológicos e, assim aumentou o poder de discriminação de LES e pacientes com esclerodermia, dermomiosite, polimiosite e artrite reumatoide (Tan *et al.*, 1982).

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

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

**Fonte:** Tan *et al.*, 1982.

O desenvolvimento da doença envolve vários processos imunes complexos, onde a hiperatividade dos linfócitos T e B, a produção de autoanticorpos e a deposição de complexos imunes causam danos aos órgãos por deposição nos tecidos (Suh & Kim, 2008). As células B são essenciais para a expressão da doença: além de produzir autoanticorpos, que medeiam os danos dos tecidos, o desenvolvimento das células B e apresentação de antígenos e autoantígenos às células T contribuem para a expressão da doença, independentemente da sua capacidade para produzir anticorpos (Tsokos, 2011).

As células T em pacientes com LES exibem estruturações alteradas e têm um papel importante na progressão e patologia da doença. As células T nesta doença atacam tecidos alvo próprios, além de promover a inflamação com secreção de citocinas e ativar células dendríticas e células B (Crispín *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009). Embora as circunstâncias e mecanismos que facilitam a ignição da doença permaneçam desconhecidos, evidências indicam que, uma vez que a autotolerância seja quebrada, células B e T participam na amplificação e perpetuação da autoimunidade com respostas inflamatórias (Crispín *et al.*, 2008). Os mecanismos regulatórios celular e humoral falham ao tentar impedir esse processo, conseqüentemente a inflamação e dano ao tecido contribuem para a amplificação e perpetuação da lesão dos órgãos, causando a patogênese da doença (Juang *et al.*, 2005).

Apesar de a etiologia da doença ainda ser desconhecida, fatores genéticos e ambientais estão envolvidos (Kelly *et al.*, 2002). O tabagismo tem se mostrado como um fator de associação e de agravamento do LES (Ghaussy *et al.*, 2003). Estudos mostraram que pacientes com hábito tabagista tem um significativo aceleração do desenvolvimento da doença quando comparado com pacientes não fumantes. Considerando que a doença pode ter envolvimento de fatores ambientais, não é de se surpreender que as substâncias do cigarro (que inclui aproximadamente 4,7 mil substâncias tóxicas, como monóxido de carbono, cianetos, hidrazina, hidro-quinona entre outros) exerçam uma atividade sobre a manifestação da doença (Mongey & Hess, 1997 *apud* Ghaussy *et al.*, 2003; Pyatt & Stillman, 1998; Ghaussy *et al.*, 2003; Ministério da Saúde, 2012).

### **1.1.1 Epidemiologia**

O LES é uma doença que atinge principalmente mulheres jovens em idade reprodutiva, entre 20 e 45 anos, onde em cada dez pacientes,



nove são mulheres (SBR, 2009). A prevalência da doença na população mundial varia de 20 a 150 casos para cada 100.000 habitantes, sendo que a prevalência mais alta é a brasileira (Pons-Estel *et al.*, 2010). Fatores étnicos também estão associados com um risco aumentado de desenvolvimento de LES. Mulheres afro-americanas têm de três a quatro vezes mais chances de desenvolver LES do que as mulheres euro-descendentes. (Bae & Fraser, 1998; Bongu *et al.*, 2002).

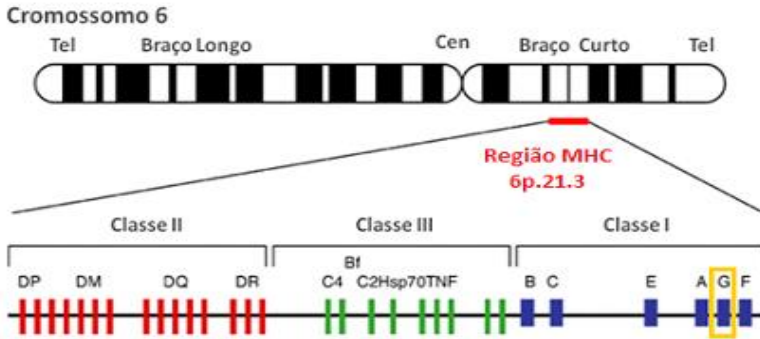
No Brasil, por não dispor de números exatos, estimativas indicam que existam cerca de 65.000 pessoas com lúpus, sendo a maioria mulheres, com uma estimativa de uma a cada 1.700 mulheres afetadas pela doença no Brasil (SBR, 2009). Utilizando essas informações e os dados populacionais de Santa Catarina, coletados no Censo 2010 realizado pelos IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), foi inferido que, no estado de Santa Catarina, existem aproximadamente 3.700 mulheres portadoras de lúpus (IBGE, 2011).

Apesar da doença geralmente se manifestar em mulheres na idade reprodutiva, tem sido sugerido que a idade de apresentação da doença modifica o curso e evolução desta, com implicações tanto clínicas quanto terapêuticas. O lúpus pediátrico, que é o diagnóstico ou manifestação da doença antes dos 16 anos de idade, é responsável por cerca de 8 a 15% de todos os casos de LES. Esta manifestação precoce geralmente apresenta um quadro mais severo da doença, com maior proporção de casos com envolvimento sistêmico dos órgãos, particularmente o envolvimento renal e neuropsiquiátrico. Contudo, existe também a possibilidade da manifestação tardia da doença (após os 50 anos de idade), o que antes se pensava ser uma condição rara e que, na verdade, compromete mais de 18% dos pacientes. Pacientes com lúpus tardio tendem a ter uma doença insidiosa, com um menor grau de atividade e envolvimento de órgãos (Tsokos *et al.*, 2007).

## 1.2 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE

A descoberta da função do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade), fundamental no reconhecimento dos antígenos pelas células T CD4 e CD8, revolucionou o campo da imunologia na compreensão da ativação e das funções dos linfócitos. Em humanos, o MHC é composto pelo Complexo de Histocompatibilidade Humano (HLA), se localiza no braço curto do cromossomo seis, especificamente na posição 6p21.3, ocupando uma região cromossômica de aproximadamente 3,6 megabases de DNA contendo mais de 200 genes,

muitos com importante papel no sistema imune (Aguado *et al.* 1999; Dawkins *et al.* 1999; Rhodes & Trowsdale 1999; Parham, 2005; Castelli *et al.*, 2011). A região do HLA pode ser subdividida de acordo com a estrutura e função dos produtos moleculares (Figura 2) (Horton *et al.*, 2004).



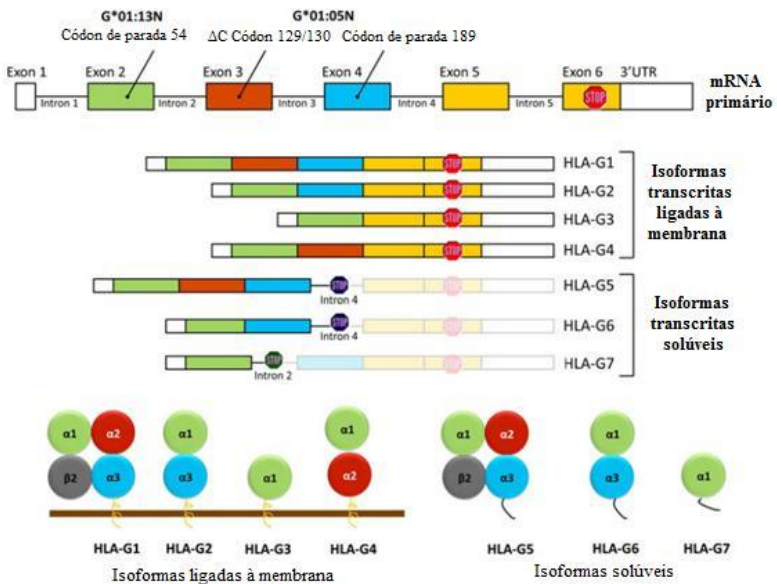
**Figura 2.** A localização da região do MHC humano (HLA) no cromossomo 6, a disposição dos genes dentro das classes II, III e I e em amarelo destaque para o locus HLA-G.

**Adaptado de:** Cambridge Journals, 2012.

A região de classe I contém seis *loci* gênicos, que são divididos em clássicos (ou classe Ia) e não clássicos (ou classe Ib). Os genes clássicos incluem *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*, que possuem expressão constitutiva na membrana celular de quase todas as células nucleadas. Os genes não clássicos, que são menos polimórficos que os de classe Ia, incluem *HLA E*, *F* e *G*, e apresentam expressão celular restrita, sendo o último citado objeto desse estudo. Além destes, existem os *loci HLA H*, *J*, *K* e *L*, sem produto protéico associado e, portanto, classificados de pseudogenes (Rizzo *et al.*, 2012). As moléculas de classe II estão contidas no *HLA-D*, que foi subdividido nas subregiões *DE*, *DQ*, *DZ/DO* e *DP*. Outros genes são encontrados nessa região (como *TAP1* e *2* e *LMP2*, entre outros), contudo não codificam produtos moleculares do grupo de antígenos de histocompatibilidade. Na classe III (localizada entre as regiões I e II), se encontram genes importantes para a imunidade inata, como genes que atuam na ativação do sistema complemento, como *Bf*, *C2*, *C4A*, *C4B*, genes que codificam citocinas, como *TNF $\alpha$*  e *LT $\beta$* , entre outros (Graham *et al.*, 2002; Lewin, 2009).

### 1.2.1 HLA-G

O HLA-G possui 4396 pb em sua estrutura, que são divididos em sete íntrons e oito éxons (Figura 3) (Moreau *et al.*, 2009; Castelli *et al.*, 2011; Donadi *et al.*, 2011). O éxon 1 transcreve para o peptídeo sinal, os éxons 2, 3 e 4 codificam os domínios extracelulares da proteína ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  respectivamente), o éxon 5 codifica o domínio transmembranar, portanto ausente nas isoformas solúveis. O éxon 6 é responsável por codificar a cauda citoplasmática da molécula, o códon de parada está presente no segundo códon desse éxon, o que resulta em uma cauda mais curta em comparação às moléculas de HLA I clássicas. Por último, o éxon 7, embora chamado de éxon por seguir a classificação dos HLA clássicos, nunca se apresenta no RNA mensageiro (mRNA) maduro, pois é removido durante o processamento do RNA. O éxon 8 não é traduzido, sendo considerado como parte integrante da região 3' não traduzida (3'UTR) do mRNA (Larsen & Hviid, 2009; Moreau *et al.*, 2009; Donadi *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Estrutura do gene *HLA-G* e sua expressão. O mRNA primário e seus seis processamentos de mRNAs possíveis estão ilustrados, assim como a identificação dos éxons presentes e a localização de códon de parada. São

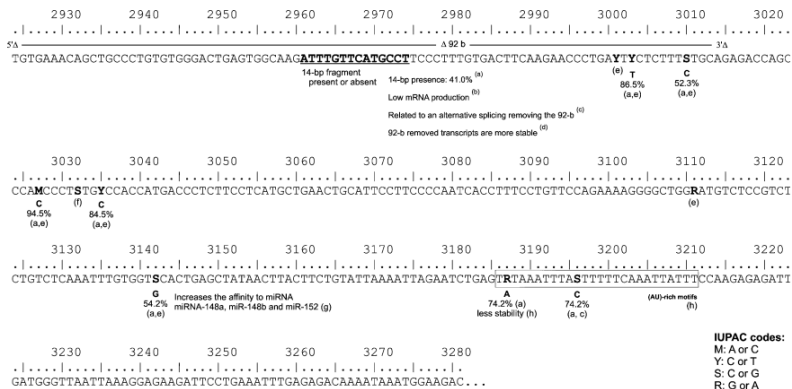
geradas sete isoformas proteicas por processamento alternativo, sendo quatro aderidas à membrana e três solúveis.

**Adaptado de:** Donadi *et al.*, 2011.

Apesar das funções das isoformas ainda serem pouco compreendidas, tem sido proposto que elas podem estar envolvidas na modulação da resposta imune em diversas situações fisiológicas. A produção das diferentes isoformas de HLA-G é direcionada por mecanismos de regulação e, dependendo da situação fisiológica e do tipo celular envolvido, algumas isoformas são expressas e outras não (Campbell *et al.*, 2012).

Os genes do MHC de classe I e II são os mais polimórficos presentes no genoma, com um número total estimado de alelos na população de cerca de 3.500 (Abbas *et al.*, 2011). O *HLA-G*, comparado com os outros genes de HLA, é pouco polimórfico, possuindo 50 alelos descritos, que codificam 16 proteínas funcionais distintas e dois alelos nulos (Larsen & Hviid, 2009; Donadi *et al.*, 2011). Nas regiões 5'URR e 3'UTR o grau de variações nucleotídicas é relativamente mais alto (Donadi *et al.*, 2011). Na região promotora do *HLA-G* foram identificados, até o ano de 2011, 29 SNPs (Castelli *et al.*, 2011). Essas variações podem implicar, diretamente, na regulação da expressão desse gene, uma vez que, muitos desses polimorfismos estão dentro ou próximos de conhecidos ou supostos elementos reguladores da transcrição (Moreau *et al.*, 2009).

A região 3'UTR do *HLA-G* possui oito sítios polimórficos descritos: um polimorfismo de presença (que aqui chamaremos de inserção, ou In) ou ausência (que aqui será chamada de deleção, ou Del) de um fragmento de 14pb (*14pb InDel*) e sete SNPs (+3003 T/C, +3010 C/G, +3027 A/C, +3035 C/T, +3142 G/C, +3187 A/G e +3196 G/C) (Figura 4) (Larsen & Hviid, 2009; Moreau *et al.*, 2009; Menier *et al.*, 2010). Ao menos três desses sítios polimórficos foram associados à regulação dos níveis de expressão do *HLA-G*: (1) o polimorfismo de 14pb InDel; (2) a presença de uma guanina na posição +3142 G/C; (3) a presença de uma adenina na posição +3187 A/G (Larsen & Hviid, 2009; Moreau *et al.*, 2009; Menier *et al.*, 2010). Embora o polimorfismo 14pb InDel possa estar associado com o controle da produção de *HLA-G*, podendo também modular a estabilidade do mRNA, os mecanismos que estão envolvidos nesse processo ainda não estão totalmente elucidados.



**Figura 4.** Sítios de variações da 3'UTR do gene *HLA-G*. Em negrito os polimorfismos observados na região 3' não traduzida do *HLA-G*, que podem influenciar a expressão do gene **Adaptado de:** Donadi *et al.*, 2011.

Como foco do nosso estudo, iremos analisar os alelos que apresentam a inserção da sequência de 14pb (5'-ATTGTTCATGCCT-3') que são associados, em células de trofoblastos, com uma produção mais baixa dessa molécula, tanto para as isoformas solúveis como para as isoformas ligadas à membrana. Por outro lado, os mRNA que possuem os 14pb a mais podem sofrer um processamento alternativo que leva a remoção de 92 bases do mRNA maduro. Esse processo resulta em transcritos menores, assim a molécula se torna mais estável se comparada com o mRNA que não sofre essa deleção (Donadi *et al.*, 2011).

Dependendo da situação fisiológica ou clínica, a expressão de *HLA-G* pode ser benéfica ou prejudicial ao organismo. Em condições patológicas, nas quais uma resposta imune vigorosa e prolongada é necessária, a expressão de *HLA-G* é prejudicial, como nos casos de câncer e nas doenças virais crônicas. Contrário a isso, nos casos em que uma resposta imune vigorosa é indesejável, a presença de *HLA-G* é vantajosa, como nos casos de transplantes e de doenças autoimunes (Donadi *et al.*, 2011).

Tanto nesses casos quanto em condições saudáveis, as moléculas *HLA-G* interagem com determinados receptores de membrana, presentes em diversos tipos celulares, inibindo as respostas do sistema imune. Os três receptores, atualmente descritos, relacionados à atividade do *HLA-G* são: os receptores de leucócitos semelhantes às

imunoglobulinas, ILT2 (ILT2/CD85j/LILRB1) e ILT4 (ILT4/CD85d/LILRB2) e o receptor de célula NK semelhante à imunoglobulina, KIR2DL4 (KIR2DL4/ CD158d) (Moreau *et al.*, 2009; Campbell *et al.*, 2012). O receptor ILT2 é expresso por linfócitos B, linfócitos T, células NK, células dendríticas, monócitos e macrófagos. O receptor ILT4, por outro lado, é especificamente mielóide, sendo expresso somente por células dendríticas, monócitos e macrófagos. O receptor KIR2DL4 tem sua expressão limitada à subpopulação de NK CD56<sup>bright</sup>, células essas que constituem uma pequena parcela das células NK periféricas (Carosella *et al.*, 2008; Donadi *et al.*, 2011).

Esses três receptores são expressos de maneira diferenciada por cada um dos tipos celulares descritos, e os efeitos das suas interações com HLA-G têm sido demonstrados. A molécula HLA-G pode inibir, por exemplo, as funções citolíticas das células NK, a maturação de células dendríticas, as funções citolíticas antígenos-específicas das células T CD8, as respostas aloproliferativas das células T CD4, a produção de citocinas por células T, além de induzir a apoptose celular (Donadi. *et al.*, 2011). A molécula de HLA-G tem a capacidade de atuar diretamente na atividade das células participantes da resposta imune. Essa característica tem feito dessa molécula um alvo atrativo de estudos para a compreensão dos mecanismos de diversas situações clínicas como, por exemplo: gravidez e suas complicações, transplantes, cânceres, infecções virais e doenças inflamatórias e autoimunes (Carosella *et al.*, 2008; Carosella *et al.*, 2011; Donadi *et al.*, 2011).

### 1.2.2 HLA e LES

Entre os genes associados com doenças autoimunes, as associações mais fortes são com genes do MHC. Em LES, os genes *HLA DRB1\*0301* e *DRB1\*1501* foram associados à doença em populações de ascendência européia, com risco relativo para esses indivíduos de 2 a 3, e se ambos os haplótipos estiverem presentes, o risco relativo é cerca de 5 (Abbas *et al.*, 2011). Em doenças como o diabetes tipo 1, foram identificados de 20 a 30 genes associados à doença. Na maior parte das doenças autoimunes, o *locus* HLA contribui sozinho para metade ou mais da susceptibilidade genética. Tipagem HLA em grandes grupos de pacientes com diversas doenças autoimunes demonstram que alguns alelos HLA ocorrem com maior frequência nestes pacientes do que na população geral (Abbas *et al.*, 2011). Polimorfismos da região 3'UTR do *HLA-G* foram associados ao LES em alguns estudos como um fator

de susceptibilidade à doença, como o polimorfismo de 14pb e o +3142C>G (Veit *et al.*, 2009; Consiglio *et al.*, 2011).

A expressão do HLA-G em doenças inflamatórias e autoimunes é uma área relativamente recente de pesquisa. Com base nos achados de que o HLA-G poderia desviar as respostas das células T, levantou-se a hipótese de que o HLA-G seria uma molécula protetora nas respostas inflamatórias, e desde então, numerosos estudos tem sido realizados na área da reumatologia (Brenol *et al.*, 2012). No LES, publicações têm demonstrado resultados diversos: um estudo relatou níveis mais elevados de HLA-G no plasma dos pacientes, enquanto outro relatou níveis mais baixos. Esse último estudo também relatou uma associação genética com o polimorfismo de 14 pb, na qual o genótipo *14pb\*In/In* foi um fator de risco para o desenvolvimento do LES (Rosado *et al.*, 2008; Rizzo *et al.*, 2008 ; Brenol *et al.*, 2012).

É cada vez mais evidente que a molécula HLA-G pode ser capaz de exercer ação direta no sistema imunológico por meio de seus efeitos imunorregulatórios. Assim, torna-se uma candidata com grande potencial para exercer influência na atividade e expressão de doenças reumatológicas. Embora vários estudos tenham apontado para a associação de polimorfismos ou mesmo níveis plasmáticos de HLA-G com diversas situações clínicas, os resultados ainda são controversos, e mais trabalhos científicos são necessários para comprovar suas potenciais propriedades.

### 1.3 INSERÇÃO *Alu* *HG*

Além dos *loci* da região de genes do MHC, muitas sequências não codificadoras foram identificadas, incluindo os membros da família *Alu*, que possuem sequências repetitivas de DNA dispersas pelo genoma (García-Obregón, 2012). Essas sequências de DNA são transponíveis, ou seja, possuem a capacidade de trocar de posição no genoma, podendo apresentar polimorfismos de sítios de inserção e uma variabilidade no número de cópias dentro e entre espécies (Capy *et al.*, 1998). Os elementos transponíveis desempenham um papel significativo na geração de diversidade de sequências de DNA durante a evolução dos primatas (Ullu & Tschudi 1984).

As características vantajosas dos elementos *Alu* em estudos moleculares com perspectivas evolutivas foram exaustivamente analisadas por diversos autores (Lander *et al.*, 2001; Batzer & Deininger, 2002; Terreros *et al.*, 2009; Gómez-Pérez *et al.*, 2011; entre

outros). Essencialmente, essas características são: (1) a neutralidade seletiva de inserções *Alu* polimórficas, (2) possibilidade de conhecer o estado ancestral (falta de inserção), (3) a existência de uma única mutação comum para todos os cromossomos com a mesma inserção (identidade por descendência e não apenas por estado), (4) e não existir mecanismo conhecido para a remoção completa e específica de um elemento *Alu*. *Loci* do tipo *Alu* podem ser considerados como marcadores estáveis e conservados que refletem eventos evolutivos únicos e com utilidade na reconstrução da história humana demográfica e evolutiva (García-Obregón *et al.*, 2012).

Como consequência do acúmulo de eventos de inserção ao longo do tempo evolutivo, elementos transponíveis constituem agora cerca de metade do genoma humano. As famílias de elementos móveis *Alu*, L1, e SVA ainda estão duplicando, gerando variação entre genomas individuais. Inserções de elementos móveis (MEI) foram identificadas como causas de doenças genéticas, incluindo a hemofilia, neurofibromatose e vários cânceres (Stewart *et al.*, 2011)

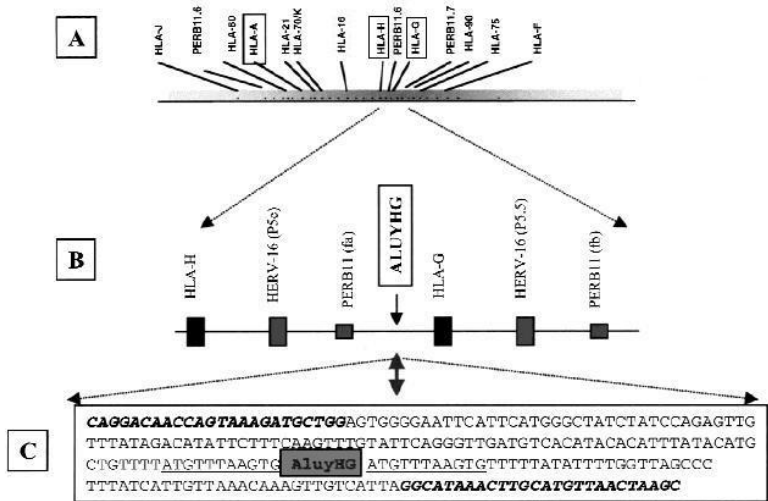
Retrotransposons (a classe de elementos transponíveis que utilizam um intermediário de RNA para se duplicar (Capy *et al.*, 1998), no genoma humano de referência, são remanescentes de eventos de retrotransposições antigas, e não são mais capazes de retrotranspor. No entanto, uma fração de elementos móveis permanece ativa e contribui para a variação entre indivíduos na população humana. Estes elementos ativos pertencem quase exclusivamente às famílias *Alu*, L1, e SVA de não LTR retrotransposons (Mills *et al.*, 2007).

A família *Alu* é o elemento móvel mais comum em genomas de primatas, com mais de 1,1 milhões de cópias no *Homo sapiens* (Kriegs *et al.*, 2007; Rhead *et al.*, 2010). O comprimento total da sequência de uma inserção *Alu* é de cerca de 300 bp. Elementos *Alu* são classificados em uma gama de sub-famílias, que têm inclinações diferentes para a retrotransposição, e são identificadas de acordo com as alterações de sequência. Várias sub-famílias de *AluY* estão ativas e são responsáveis pela maior parte da variação de MEI em *Homo sapiens*. O genoma humano de referência contém mais de 140.000 elementos *AluY* anotados (Stewart *et al.*, 2011).

Durante uma análise comparativa da sequência genômica do bloco HLA de classe I, Kulski *et al.* (1999) identificou um novo membro da subfamília *AluYb8*, que foi designado *AluYHG*, alocado entre o *HLA-A* e



o *HLA-G*, a aproximadamente 88Kb do gene *HLA-A* (Figura 5) (Kulski *et al.*, 2001).



**Figura 5.** Localização do *AluYHG* no bloco de MHC: (A) mapa do local e da distribuição da classe I de HLA de codificação e de não codificação de genes, incluindo os HLA-A; (B) mapa da localização do sítio de inserção *AluYHG* relativamente aos *loci* HLA-H e G; (C) A sequência *AluYHG* é representada pela caixa que é flanqueada por sequências de repetição direta (sublinhada).

**Adaptado de:** Kulski *et al.*, 2001.

Marcadores do tipo MEI, como as *Alu*, são interessantes para a genética de populações por dois motivos: (a) é extremamente pequena a probabilidade de que uma determinada sequência ocorra no mesmo local em duas pessoas diferentes, salvo quando estas pessoas compartilham um ancestral comum, uma vez que a taxa de inserção dos elementos *Alu* é muito baixa e há muitos locais em que esses elementos podem se inserir (Batzner & Deininger, 1991), e (b) o estado ancestral do *locus* é a ausência de inserção (Batzner *et al.*, 1994; Whitherspoon *et al.*, 2006). Além disso, diferentes inserções *Alu* cujas distribuições geográficas são conhecidas podem ser utilizadas em conjunto para indicar afinidade geográfica de uma amostra (Cordeaux *et al.*, 2007).



## 2 JUSTIFICATIVA

Por décadas, a perda da tolerância a moléculas próprias do organismo vem sendo um dos grandes enigmas para imunologistas. É bem aceito que a patogênese de doenças autoimunes é multifatorial, com fatores genéticos e ambientais interagindo para determinar o aparecimento e evolução da doença. No entanto, a quantificação de influências ambientais é notoriamente difícil, enquanto inúmeras evidências sugerem que fatores genéticos são os principais determinantes na susceptibilidade e progressão de doenças autoimunes (Invernizzi & Gershwin, 2009). Entender quais os fatores genéticos que contribuem para essas doenças pode ter um efeito significativo na saúde da população humana (Gergersen & Behrens, 2006).

O LES, por se tratar de uma doença multifatorial e multigênica, necessita de maiores estudos sobre a sua etiologia, dos fatores genéticos associados e sua relação com os fatores ambientais. A expressão de HLA-G está relacionada ao escape da imunovigilância por mecanismos inibitórios de linfócito T e NK, evidenciando que o *HLA-G* codifica uma molécula essencial para o prognóstico relacionado a evolução e gravidade de doenças. As variações da expressão do gene *HLA-G*, por exemplo, que podem ser decorrentes de polimorfismos do gene, tem sido relacionadas a diversas condições patológicas, como: infecções virais crônicas, tumores, doenças autoimunes e doenças inflamatórias (Larsen & Hviid, 2009; Donadi *et al.*, 2011). Para essas últimas, tem sido proposto que a expressão do *HLA-G* é um possível mecanismo de proteção tecidual contra respostas inflamatórias (Consiglio *et al.*, 2011). Diversos aspectos relacionando à doença e ao polimorfismo da 3'UTR do *HLA-G* permanecem desconhecidos e controversos, fazendo-se necessária a complementação de estudos que auxiliem na elucidação dos mecanismos de regulação da expressão desse gene. A família *Alu* é o elemento móvel mais comum em genomas de primatas, com mais de 1,1 milhões de cópias no *Homo sapiens* (Kriegs *et al.*, 2007; Rhead *et al.*, 2010). A sequência *AluHG* encontra-se na região intergênica, flanqueada pelos loci *HLA-A* e *HLA-G*. Um possível desequilíbrio de ligação entre essa região e os loci vizinhos pode ser um potencial marcador para essa região, ajudando no diagnóstico da doença. Essas associações entre LES, o polimorfismo do gene *HLA-G* e a inserção do *AluHG* podem, no futuro, auxiliar no diagnóstico, no prognóstico e no direcionamento de terapias para essa patologia.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar polimorfismos da região 3' não traduzida (3'UTR) do gene *HLA-G* e da inserção *AluyHG* em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e indivíduos controles, no estado de Santa Catarina, buscando um melhor entendimento da ação desses *loci* na manifestação da doença.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Observar a variabilidade da 3'UTR do gene *HLA-G* e da inserção *AluyHG* em uma amostra populacional do estado de Santa Catarina;
2. Calcular as frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo de 14pb na 3'UTR do gene *HLA-G* e da inserção *AluyHG* em pacientes com LES e em indivíduos-controle;
3. Inferir os haplótipos envolvendo estes *loci* analisados em pacientes com LES e em indivíduos-controle;
4. Verificar se há associação entre os alelos, genótipos, haplótipos, combinações haplotípicas e dados epidemiológicos com a doença estudada;
5. Relacionar os dados encontrados neste estudo com a presença de LES;
6. Comparar as frequências gênicas, genótípicas e haplotípicas observadas com dados descritos na literatura, de forma a contribuir para um melhor conhecimento da doença.
7. Verificar se existe desequilíbrio de ligação entre os *loci* estudados;
8. Na existência de desequilíbrio de ligação, verificar a possibilidade da inserção *AluyHG* se tornar um marcador da região.



#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto está vinculado a um projeto maior, em vigência, intitulado “Genética da Autoimunidade: Polimorfismos em Lúpus Eritematoso Sistêmico e Artrite Reumatoide em pacientes de Santa Catarina”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEP-UFSC), sob parecer 172/06, de 26 de junho de 2006, que esteve em vigência até julho de 2009 e foi prorrogado até março de 2013.

As amostras populacionais que foram coletadas e utilizadas no presente trabalho são parte do Banco de DNA do Laboratório de Polimorfismos Genéticos (LAPOGE), situado no Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (BEG-CCB-UFSC) e coordenado pela Profa. Dra. Ilíada Rainha de Souza. A coleta foi feita em colaboração com o Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU) representado pelos médicos Dr. Ivânio Alves Pereira e Dra. Adriana Fontes Zimmermann.

##### 4.1 COLETA

A população estudada é constituída de pacientes com LES, atendidos pelo HU-UFSC, no período de junho de 2006 a junho de 2012, que se dispuseram voluntariamente a participar da pesquisa. O grupo controle é composto por voluntários sem LES diagnosticado e sem histórico familiar do mesmo, que consentiram em participar dessa pesquisa, recebendo ambos os grupos um termo de consentimento livre e esclarecimento e aceitando participar do projeto ao assinar a declaração de consentimento (ANEXO A para controles e B para pacientes).

Os dados familiares e epidemiológicos dos controles e pacientes foram obtidos durante entrevista feita através de questionários estruturados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC (ANEXOS C e D). Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos nos prontuários médicos.

No presente estudo, foram utilizadas 150 pacientes e 150 controles, ambos provenientes do Estado de Santa Catarina, Brasil. Destes indivíduos foram coletados 10mL de sangue periférico em tubos contendo EDTA.

#### 4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

O material biológico obtido das coletas foi centrifugado (*Centrifuge 206 BL Excelsa II*®) a 3.000g (1835rpm), durante 20 minutos a temperatura ambiente para a separação dos constituintes do sangue. Após a centrifugação, foram separados os componentes sanguíneos: o plasma, que foi estocado para futuras pesquisas; a camada de leucócitos (*buffy coat*), utilizados na extração de DNA genômico, e o concentrado de hemácias, também armazenado para futuras pesquisas. As amostras separadas foram armazenadas em freezer a -20°C.

#### 4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A extração do DNA genômico foi feito de acordo com protocolo adaptado da técnica de *salting out*, descrita por John *et al.* (1991) e modificada por Lahiri & Nurnberger (1991).

##### 4.3.1 Reagentes e Soluções

- 1) Solução de Lise I (Tris-HCl 0,01M, *Amresco*®; Sacarose 0,32M, *Merck*®; MgCl<sub>2</sub> 0,0025M; Triton X 100 – 1%, *Nuclear*®);
- 2) Solução de Lise II (Tris-HCl 0,01M, *Amresco*®; KCl 0,05M, *Vetec*®); MgCl<sub>2</sub> 0,0025M, *Nuclear*®); Nonidet – 1%, *Amresco*®; TWEEN 20 – 1%, *Amresco*®);
- 3) SDS 10% (*Amresco*®);
- 4) Solução de Perclorato de Sódio 5,0M (*Vetec*®);
- 5) Solução Saturada de NaCl 6,0M (*Nuclear*®);
- 6) TE (Tris-HCl 1M, *Amresco*®; EDTA 0,5M, *Vetec*®);
- 7) Álcool Isopropílico Absoluto(*Merck*®) TA;
- 8) Etanol 70% (*Merck*®), TA.

Para cada amostra, foram separados 100µl da camada de leucócitos em microtubos de polipropileno de 1,5mL (tipo *Eppendorf*), utilizando micropipeta e ponteiras estéreis. Em seguida, 1,0mL de Solução de Lise I foi adicionado em cada um desses microtubos. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (*Centrifuge 5415D, Eppendorf*®) a 13400g (12000 rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi repetido (de 3 a 4 vezes) até que os glóbulos vermelhos fossem removidos e o precipitado apresentasse cor branca, indicando a ausência de glóbulos vermelhos no precipitado. Posteriormente, foi acrescentado ao precipitado 300µL de



Solução de Lise II, 10µL de SDS 10% e 75µL de Perclorato de Sódio 5M. As amostras foram agitadas em um agitador de tubos (*Vortex*®), em cada tubo foi acrescentado 130µL de NaCl 6M e, a seguir, as amostras foram centrifugadas a 13400g por 5 minutos a temperatura ambiente. Novos microtubos de 1,5mL foram identificados e, para esses, foram transferidos os sobrenadantes resultantes da centrifugação. Ao sobrenadante foram adicionados 300µL de Álcool Isopropílico Absoluto e as amostras foram, novamente, centrifugadas a 13400g por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi acrescentado 300µL de Etanol 70%. As amostras foram centrifugadas a 13400g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco, a temperatura ambiente, por 12h (ou *overnight*). Após a secagem dos precipitados, foi adicionado a cada tubo 100µL de TE. As amostras foram colocadas no banho-maria a 56°C, por 30 minutos e, posteriormente, armazenadas a -20°C.

#### 4.4 GENOTIPAGEM

##### 4.4.1 PCR

A genotipagem das amostras foi realizada pela amplificação de sequências-alvo específicas dos genes pela técnica PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*), utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que flanqueiam as regiões gênicas de interesse. Os oligonucleotídeos iniciadores estão listados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a PCR.

Gene	Oligonucleotídeos iniciadores	Referência
<i>HLA-G</i>	5'TGT GAA ACA GCT GCC CTG TGT 3' 5' GTC TTC CAT TTA TTT TGT CTC T 3'	Castelli <i>et al.</i> , 2010
<i>ALU-HG</i>	5' CAG GAC AAC CAG TAA AGA TGC TGG 3' 5' GCT TCA GTT AAC ATG CAA GTT TAT GCC 3'	Kulski <i>et al.</i> , 2001

Em toda PCR foi utilizado um controle negativo (CN) com água ultrapura ao invés de DNA genômico para assegurar a ausência de contaminação por DNA exógeno durante a reação.

#### 4.4.2 Genotipagem *HLA-G* 14pb

##### 4.4.2.1 Reagentes e Soluções

- 1) Água Ultrapura qsp. 25 $\mu$ L;
- 2) dNTPs 0,2mM de cada (100mM, *Invitrogen*®);
- 3) MgCl<sub>2</sub> 1,5mM (50mM, *Invitrogen*®);
- 4) Tampão de PCR 1X (10X, 0,2M Tris-HCl pH 8,5; 0,5M KCl; *Invitrogen*®);
- 5) Primer Forward 5pmol (10pmol HLAGR, *IDT*®);
- 6) Primer Reverse 5pmol (10pmol HLAGF, *IDT*®);
- 7) Taq DNA Polymerase Platinum 0,5U/ $\mu$ L (5U/  $\mu$ L; *Invitrogen*®).

##### 4.4.2.2 Procedimento

Para a reação de amplificação foram adicionadas as concentrações mencionadas acima em tubos de 0,6mL (tipo *ependorf*) e adicionados 2 $\mu$ L de DNA genômico da amostra desejada. Essas amostras foram colocadas em um termociclador (*Mastercycler, Eppendorf*®) e submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e, em seguida, a 30 ciclos de: 95°C por 45s, 56°C por 45s e 72°C por 60s; e um passo de extensão final a 72°C por 7 minutos (Castelli *et al.*, 2010).

##### 4.4.2.3 Leitura dos resultados no gel

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel vertical de poliacrilamida em concentração de 7%. Estes géis foram feitos adicionando: 31,5ml de H<sub>2</sub>O; 9ml de Solução de Acrilamida/Bis-acrilamida 29:1; 4,5ml de TBE 10%; 67,5 $\mu$ L de TEMED e 675 $\mu$ L de Persulfato de Amônio 10%. Essa solução foi colocada entre as placas de vidro e, após a polimerização do gel, as placas foram encaixadas na cuba de eletroforese. As amostras foram preparadas da seguinte forma: 3,5 $\mu$ L de produto de PCR; 1 $\mu$ L de Tampão de Aplicação de Amostras e 1 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O; e, posteriormente, aplicadas no gel. No primeiro poço foi colocado 0,6 $\mu$ L o padrão de peso molecular de 100pb para, posteriormente, servir de parâmetro para a confirmação das bandas amplificadas. A corrida foi realizada, durante 1h e 30min, e a fonte de eletroforese (CBS, Scientific Company, Modelo EPS 4000) foi regulada de maneira que, a Voltagem (V) ficou fixa em 160 e a Amperagem (mA) e a Potência (W) ficaram livres.. Os géis foram retirados das cubas e corados com solução de Nitrato de Prata 10% para a visualização dos

fragmentos de DNA. Após a eletroforese o gel foi lido e posteriormente submetido à luz WL para ter suas imagens capturadas pelo fotodocumentador *DNR-Bio-Imaging Systems MiniBIS PRO®* através do software *GelCapture©*, que foram então analisadas (Figura 6).



**Figura 6** - Gel de poliacrilamida a 7%, corado com nitrato de prata. Fragmentos de DNA de dois diferentes tamanhos, 359pb (Inserção 14pb) e 345pb (deleção 14pb), podem ser observados após corrida eletroforética de 3horas, a 160 V. O gel digitalizado ilustra uma inserção (raia1), uma deleção (raia 2), uma inserção ; deleção (raia 3).

#### 4.4.2.4 Coloração com Nitrato de Prata

Os géis foram retirados das cubas e corados com solução de Nitrato de Prata 10% para a visualização dos fragmentos de DNA.

##### 4.4.2.4.1 Reagentes e Soluções

- 1) Solução de Nitrato de Prata 10% (10g de Nitrato de Prata, *Vetec®*; 100mL de H<sub>2</sub>O - volume final 100mL);
- 2) Solução Fixadora (160mL de Etanol Absoluto, *Merck®*, 7mL de Ácido Acético Glacial, *Nuclear®* e 833mL de H<sub>2</sub>O - volume final 1L);
- 3) Solução Reveladora (22,5g de NaOH, *Merck®*; 1L de H<sub>2</sub>O. - volume final 1L. Na hora da coloração foi adicionado 1mL de Formaldeído para cada 100mL da solução).

##### 4.4.2.4.2 Procedimento

- 1) Fixação: Após a retirada das placas de vidro e dos espaçadores, o gel foi colocado em um recipiente de vidro contendo 200mL de Solução Fixadora por 10 minutos;

- 2) Impregnação com Nitrato de Prata: Foi adicionado 2,0mL de Solução de Nitrato de Prata no recipiente contendo o gel e os 200 mL de solução fixadora, e mantida sob agitação por 5 minutos. A solução foi então descartada e o gel lavado em água quente por cerca de 10 segundos;
- 3) Revelação: A solução foi pré-aquecida em estufa a 65°C, para facilitar a reação de coloração e adicionada cuidadosamente no recipiente contendo o gel, que foi submetido à agitação por alguns minutos até que as bandas aparecessem nitidamente.;
- 4) Bloqueio da Reação: Após o gel ter sido revelado, a solução reveladora foi descartada e a reação bloqueada com a lavagem direta do gel em 100mL de Solução Fixadora;
- 5) Secagem do Gel: Após a leitura, todos os géis passaram por um processo de secagem simples para que pudessem ser armazenados para análises e confirmações posteriores. Duas folhas de papel celofane foram molhadas; uma placa de vidro, com a área maior que a do gel, foi coberta com uma das folhas; o gel foi colocado sobre a placa com o celofane sem deixar bolhas; o gel foi então bem molhado e coberto com a outra folha de celofane, também com cuidado de não deixar bolhas; este gel foi deixado secando à temperatura ambiente por dois ou três dias até a secagem completa, sendo então destacado, devidamente identificado e arquivado.

#### 4.4.3 Genotipagem *Alu*YHG

##### 4.4.3.1 Reagentes e Soluções

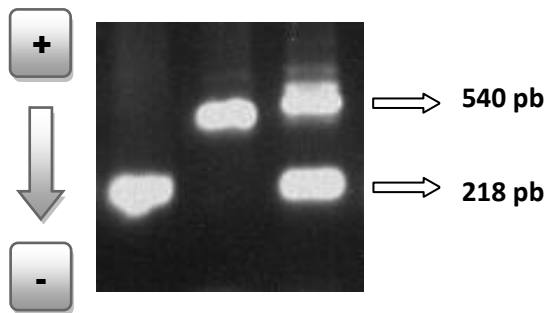
- 1) Água Ultrapura qsp. 25µL;
- 2) dNTPs 0,2mM de cada (100mM, *Invitrogen*®);
- 3) MgCl<sub>2</sub> 1,5mM (50mM, *Invitrogen*®);
- 4) DMSO 5% (98%, dimetilsulfóxido *Merk*®);
- 5) Tampão de PCR 0,8X (10X, 0,2M Tris-HCl pH 8,5; 0,5M KCl; *Invitrogen*®);
- 6) Primer Forward 3pmol (10pmol *Alu*YHGR, *IDT*®);
- 7) Primer Reverse 3pmol (10pmol *Alu*YHGF, *IDT*®);
- 8) Taq DNA Polymerase Platinum 1U/µL (5U/ µL; *Invitrogen*®).

#### 4.4.3.2 Procedimento

Para a reação de amplificação foram adicionadas as concentrações mencionadas acima em tubos de 0,6mL (tipo *eppendorf*) e adicionados 2μL de DNA genômico da amostra desejada. Essas amostras foram colocadas em um termociclador (*Mastercycler, Eppendorf®*) e submetidas a uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e, em seguida, a 30 ciclos de: 95°C por 45s, 56°C por 45s e 72°C por 60s; e um passo de extensão final a 72°C por 7 minutos (Castelli *et al.*, 2010).

#### 4.4.3.3 Leitura dos resultados no gel

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose em concentração de 1% (95V, 30 minutos) em presença do corante fluorescente *GelRed™*. Para a corrida eletroforética se utilizou: tampão TBE 0,5X (50mL de TBE 10X; 950mL de água), sendo que as mesmas concentrações foram utilizadas para preparação do gel. Após a eletroforese o gel foi submetido à luz UV para visualização da região gênica amplificada, tendo posteriormente suas imagens capturadas pelo fotodocumentador *DNR-Bio-Imaging Systems MiniBIS PRO®* através do software *GelCapture©*, que foram então analisadas (Figura 7).



**Figura 7** - Gel de agarose a 1%, na presença do corante fluorescente *GelRed™*. Podem-se visualizar fragmentos de DNA de diferentes tamanhos, 540pb (presença da inserção *AluyHG*) e 218pb (ausência da inserção *AluyHG*), após corrida eletroforética de 30 minutos, a 90V. O gel digitalizado ilustra a presença de uma deleção (raia 1), uma inserção (raia 2) e uma inserção / deleção (raia 3).

## 4.5 ANÁLISE E TRATAMENTO DE DADOS

### 4.5.1 Homogeneidade da amostra

Todas as amostras foram pareadas de acordo com idade e sexo. Os controles foram escolhidos de forma a obedecer a mesma distribuição etária e de gênero com as amostras casos, evitando assim, viés nas análises causadas pela diferença destes parâmetros. A confirmação do pareamento correto foi feito por teste de homogeneidade, através do Qui Quadrado ( $\chi^2$ ).

### 4.5.2 Dados Epidemiológicos

Foram estabelecidos critérios para facilitar a análise de dados epidemiológicos coletados, como descrito a seguir.

Para estudar a relação da doença com o tabagismo, os seguintes critérios foram utilizados: (1) exclusão de indivíduos com menos de 18 anos de idade ou mais de 65; (2) exclusão de indivíduos com menos de um ano de diagnóstico. Para os testes, foram qualificados 108 pacientes e 106 controles. A caracterização do uso de tabaco foi feita, classificando os indivíduos em três grupos: (1) indivíduos que nunca fumaram; (2) ex-fumantes (definido por não fumar há mais de um ano contando da data da entrevista); (3) fumantes (definido por fumar pelo menos um cigarro por mês por no mínimo três meses consecutivos contando da data da entrevista) (Ghaussy *et al.*, 2003).

Na análise dos dados epidemiológicos de idade de manifestação, três grupos foram formados: (1) pacientes que manifestaram a doença com menos de 16 anos; (2) pacientes que manifestaram a doença entre 16 e 50 anos; (3) pacientes que manifestaram a doença depois dos 50 anos (Tsokos *et al.*, 2007).

### 4.5.3 Estimativas das Frequências alélicas e Genotípicas

As frequências alélicas e genotípicas de cada *locus*, em casos e controles foram estimadas utilizando-se o programa GENEPOP® (Raymond & Rousset, 1995) versão 3.4.

### 4.5.4 Genótipos e análise de associação

A *Odds Ratio* pode ser compreendida como a razão das probabilidades e é comumente utilizada em estudos epidemiológicos para descrever o dano provável que pode ser causado pela exposição a um fator de risco. Quando o valor da *odds ratio* é maior que 1 e o

intervalo de confiança não incluir um número menor que 1, pode-se dizer que esta característica é um fator de risco; quando o valor da *odds ratio* for menor que 1 e o intervalo de confiança não incluir um número maior que 1, este pode ser considerado fator de proteção.

A associação dos genótipos e haplótipos com a suscetibilidade ao LES foram verificadas com base em tabelas de contingência 2x2, através do indicador de OR ou razão de chances, adotando-se um Intervalo de Confiança (IC) de 95% e considerando-se  $p=0,05$  como o valor limite de significância.

Para os cálculos de associação, foram considerados fatores de risco à manifestação do LES a presença de genes descritos em Material e Métodos e dados epidemiológicos.

Para este cálculo foi utilizado o software EpiMax Table Calculator (Health Decision Strategies, 2012).

#### 4.5.5 Determinação dos haplótipos

Para inferir os haplótipos formados pelos dois polimorfismos da região do MHC humano: a inserção *Alu* $\gamma$ *HG* (que daqui em diante será nomeado *322pb*) e *14pb\*InDel* da 3'UTR do gene *HLA-G* (que daqui em diante será nomeado *14pb*), foi utilizado o programa PHASE 2.1.1. Este programa utiliza algoritmo baesiano e apresenta melhor desempenho que os outros algoritmos (Stephens *et al.*, 2001; Stephens & Scheet, 2005).

Para esta inferência um banco contendo todos os indivíduos genotipados para os polimorfismos do presente estudo (incluindo amostras não utilizadas no presente trabalho) foi considerado. Isto porque o programa se baseia na frequência dos achados no banco disponibilizado, assim quanto maior o banco, melhor serão os resultados da inferência.

Somente os haplótipos cuja probabilidade da inferência foi superior a 0,90 foram considerados, justificando assim a redução do tamanho amostral nas análises de haplótipos. As frequências dos haplótipos, assim como das combinações haplotípicas foram então calculadas por contagem.





## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

De um total de 306 indivíduos que compõem a amostra deste estudo, 153 foram pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, grupo de casos, e 153 foram indivíduos sem histórico de LES, formando o grupo de controles, todos residentes no estado de Santa Catarina. Estes dois grupos foram pareados, para a realização dos testes estatísticos, de acordo com o gênero e a idade, conforme mostrado na tabela 3. Alguns pacientes possuem idade inferior a 18 anos, sendo que esses foram pareados com controles de menor idade encontrados, fazendo com que a média das idades entre pacientes e controles difira ligeiramente. Um teste de homogeneidade foi feito para evitar um viés na amostra.

**Tabela 3.** Classificação da amostra, de acordo com gênero e idade, entre pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (casos) e indivíduos sem diagnóstico e casos na família (controles).

Dados Epidemiológicos	Casos	Controles
<b>Gênero</b>	<b>(n=153)</b>	<b>(n=153)</b>
Feminino	150	150
Masculino	3	3
<b>Idade</b>	<b>(n=153)</b>	<b>(n=153)</b>
(Média ± SD)	37,78 ± 12,08	38,42 ± 11,69

n: número amostral; Média: média entre as amostras; SD: desvio padrão da média.

### 5.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após a obtenção dos genótipos para o sítios polimórficos da 3'UTR do gene *HLA-G* (14pb Del/In) e da inserção *Alu*yHG (322pb In/Del) de casos e controles, foram realizadas as seguintes análises: equilíbrio de Hardy-Weinberg, frequências alélicas e genotípicas (para casos e controles) e análises de associação usando *Odds Ratio*.

#### 5.2.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As distribuições das frequências para os dois polimorfismos analisados (14pb *HLA-G* e inserção *Alu*yHG) estavam de acordo com o

equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto em pacientes de LES para o *locus* 14pb *HLA-G* ( $p=0,033$ ).

### **5.2.2 Frequências Alélicas, Genotípicas e Análises de Associação**

Os resultados obtidos após os cálculos das frequências alélicas e genotípicas de casos e controles estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Frequências alélicas e genotípicas para casos e controles, cálculos de associação (OR) entre a presença dos polimorfismos e a manifestação de lúpus eritematoso sistêmico, valores de p e intervalo de confiança (IC 95%).

Polimorfismo	Casos (n)	Frequência	Controles (n)	Frequência	OR	p	IC
<b>14pb (rs1704)</b>							
In	140	0,458	120	0,392	1,307	0,120	0,936-1,826
Del	166	0,542	186	0,608			
<b>Total de Alelos</b>	<b>306</b>		<b>306</b>				
InIn	25	0,164	22	0,144	1,163	0,751	0,597-2,267
InDel	90	0,588	76	0,497	1,447	0,136	0,898-2,333
DelDel	38	0,248	55	0,359	0,589	0,046*	0,349-0,992
<b>Total de Indivíduos</b>	<b>153</b>		<b>153</b>				
<b>322pb (AF055066)</b>							
In	68	0,222	89	0,291	0,697	0,064	0,475-1,020
Del	238	0,778	217	0,709			
<b>Total de Alelos</b>	<b>306</b>		<b>306</b>				
InIn	7	0,046	9	0,059	0,767	0,797	0,250-2,323
InDel	54	0,353	71	0,464	0,63	0,062	0,388-1,023
DelDel	92	0,601	73	0,477	1,653	0,039*	1,024-2,669
<b>Total de Indivíduos</b>	<b>153</b>		<b>153</b>				

Frequências gênicas e genotípicas, análise de associação. n= número amostral; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; p= probabilidade. Os valores significativos estão anotados com \*.

Entre os dados analisados, os valores significativos indicam associação de proteção à manifestação da doença com o genótipo homozigoto *14pb\*Del\*Del* (OR=0,589,  $p=0,046$ ; IC95%= 0,349-0,992). Os alelos que apresentam a inserção da sequência de 14pb apresentam uma maior estabilidade no mRNA devido a formação de um sítio de processamento alternativo, que remove 92pb da molécula final, mas também demonstra uma menor produção dessa molécula. Assim a relação da inserção de 14pb com a expressão da molécula de HLA-G não está totalmente elucidada, devendo ser melhor caracterizada para conclusões mais concretas. É descrito que em condições patológicas, como as doenças autoimunes, onde uma resposta imune vigorosa é indesejável, a presença de HLA-G é vantajosa (Rousseau *et al.*, 2003; Donadi *et al.*, 2011). Nossos resultados demonstram que a presença da dupla dose do alelo *\*Del (14pb\*Del\*Del)* confere proteção, sugerindo que estes indivíduos devam apresentar maior expressão da molécula HLA-G. Considerando a inserção *Alu*, foi encontrada associação de risco com o genótipo homozigoto *322pb\*Del\*Del* com OR=1,653 ( $p=0,039$ ; IC95%=1,024-2,669). A inserção *Alu<sub>YHG</sub>* não possui uma função fisiológica conhecida, localizando-se entre os *loci HLA-A* e o *HLA-G*. Podemos supor que a associação significativa ocorra porque esta sequência de 322pb pode estar em desequilíbrio de ligação com algum alelo de risco dos *loci* que a flanqueiam.

Os dados epidemiológicos considerados neste estudo, como fatores de risco para a manifestação do LES (histórico familiar, tabagismo e idade de manifestação da doença), estão descritos nas Tabelas 5, 6, 7 e 8 respectivamente.

**Tabela 5.** Frequências alélicas e genotípicas para casos e controles, cálculos de associação (OR) entre o histórico familiar e a manifestação de lúpus eritematoso sistêmico, valores de intervalo de confiança (IC 95%) e p.

Polimorfismo	Com Histórico Familiar (n)	Frequência	Sem Histórico Familiar (n)	Frequência	OR	p	IC
<b><i>14pb</i></b>							
<i>In</i>	21	0,362	110	0,474	0,629	0,166	0,333-1,186
<i>Del</i>	37	0,638	122	0,526			
<b>Total de Alelos</b>	<b>58</b>		<b>232</b>				
<i>InIn</i>	3	0,103	19	0,164	0,589	0,602	0,128-2,342
<i>InDel</i>	15	0,517	72	0,620	0,655	0,421	0,267-1,603
<i>DelDel</i>	11	0,380	25	0,216	2,224	0,112	0,853-5,778
<b>Total de Indivíduos</b>	<b>29</b>		<b>116</b>				
<b><i>322pb</i></b>							
<i>In</i>	16	0,276	50	0,216	1,387	0,421	0,683 - 2,795
<i>Del</i>	42	0,724	182	0,784			
<b>Total de Alelos</b>	<b>58</b>		<b>232</b>				
<i>InIn</i>	2	0,069	5	0,043	1,644	0,923	0,208-10,384
<i>InDel</i>	12	0,414	40	0,345	1,341	0,633	0,538-3,324
<i>DelDel</i>	15	0,517	71	0,612	0,679	0,472	0,278-1,661
<b>Total de Indivíduos</b>	<b>29</b>		<b>116</b>				

Frequências gênicas e genotípicas, análise de associação. n= número amostral; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; p= probabilidade. Não foram encontrados valores significativos.

**Tabela 6.** Frequências de fumantes, ex-fumantes e nunca fumantes para casos e controles, cálculos de associação (OR) entre o hábito tabagista e a manifestação de lúpus eritematoso sistêmico, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e *p*.

GRUPOS	Casos (n)	Frequências	Controles (n)	Frequências	OR	<i>p</i>	IC
<b>FUMANTE</b>	31	0,258	14	0,117	2,637	0,009*	1,258 - 5,584
<b>EX FUMANTE</b>	12	0,100	14	0,117	0,833	0,818	0,346 - 2,039
<b>NUNCA FUMO</b>	77	0,642	92	0,766	0,545	0,047*	0,298 - 0,994
<b>Total de Indivíduos</b>	120		120				

Análise de associação. n= número amostral; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; *p*= probabilidade. Os valores significativos estão anotados com \*.

**Tabela 7.** Frequências alélicas e genotípicas para casos e controles, cálculos de associação (OR) entre o hábito tabagista e a manifestação de lúpus eritematoso sistêmico, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e *p*.

Polimorfismo	Fumante				OR	<i>p</i>	IC	Nunca Fumou				OR	<i>p</i>	IC
	Casos	Freq	Cont	Freq				Casos	Freq	Cont	Freq			
<b>14pb</b>														
In	25	0,403	14	0,500	0,676	0,530	0,250 - 1,820	71	0,461	69	0,375	1,43	0,137	0,901 - 2,256
Del	37	0,597	14	0,500				83	0,539	115	0,625			
<b>Total</b>	<b>62</b>		<b>28</b>					<b>154</b>	<b>184</b>					
InIn	3	0,097	4	0,286	0,268	0,24	0,038 - 1,789	12	0,156	13	0,141	1,12	0,962	0,443 - 2,839
InDel	19	0,613	6	0,428	2,111	0,41	0,493 - 9,263	47	0,610	43	0,468	1,79	0,089	0,923 - 3,461
DelDel	9	0,290	4	0,286	1,023	1	0,210 - 5,166	18	0,234	36	0,391	0,48	0,043*	0,229 - 0,979
<b>Total</b>	<b>31</b>		<b>14</b>					<b>77</b>		<b>92</b>				
<b>322pb</b>														
In	12	0,194	9	0,321	0,507	0,290	0,164 - 1,566	39	0,253	56	0,304	0,78	0,358	0,466 - 1,288
Del	50	0,806	19	0,679				115	0,747	128	0,696			
<b>Total</b>	<b>62</b>		<b>28</b>					<b>154</b>	<b>184</b>					
InIn	1	0,032	1	0,071	0,433	1	0,011 - 17,394	4	0,052	5	0,054	0,95	1	0,206 - 4,287
InDel	10	0,323	7	0,500	0,476	0,42	0,107 - 2,068	31	0,403	46	0,500	0,67	0,267	0,349 - 1,300
DelDel	20	0,645	6	0,429	2,424	0,3	0,562 - 10,769	42	0,545	41	0,446	1,49	0,256	0,777 - 2,874
<b>Total</b>	<b>31</b>		<b>14</b>					<b>77</b>		<b>92</b>				

Análise de associação. n= número amostral; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; *p*= probabilidade; Freq= frequência; Cont= controles. Os valores significativos estão anotados com \*.

**Tabela 8.** Frequências alélicas e genotípicas para casos e controles, cálculos de associação (OR) entre a idade de manifestação de lúpus eritematoso sistêmico, valores de intervalo de confiança (IC, 95%) e *p*.

<b>Polimorfismo</b>	<b>Idade &lt;16 (n)</b>	<b>Frequência</b>	<b>OR</b>	<b><i>p</i></b>	<b>IC</b>
<b>14pb</b>					
In	11	0,344	0,59	0,24	0,255 - 1,341
Del	21	0,656			
<b>Total</b>	<b>32</b>				
InIn	1	0,063	0,31	0,43	0,015 - 2,464
InDel	9	0,563	0,89	1	0,282 - 2,842
DelDel	6	0,374	1,97	0,35	0,581 - 6,507
<b>Total</b>	<b>16</b>				
<b>322pb</b>					
In	10	0,312	1,693	0,284	0,703 - 4,012
Del	22	0,688			
<b>Total</b>	<b>32</b>				
InIn	1	0,062	1,456	1	0,061 - 13,878
InDel	8	0,500	1,978	0,306	0,625 - 6,272
DelDel	7	0,438	0,476	0,253	0,148 - 1,504
<b>Total</b>	<b>16</b>				



<b>Polimorfismo</b>	<b>Idade <math>\geq 16</math> e <math>\leq 50</math> (n)</b>	<b>Frequência</b>	<b>OR</b>	<b><i>p</i></b>	<b>IC</b>
<b>14pb</b>					
In	120	0,472	1,43	0,32	0,747 - 2,760
Del	134	0,528			
<b>Total</b>	<b>254</b>				
InIn	23	0,181	2,65	0,31	0,548 - 17,519
InDel	74	0,583	0,87	0,93	0,337 - 2,237
DelDel	30	0,236	0,7	0,6	0,253 - 1,951
<b>Total</b>	<b>127</b>				
<b>322pb</b>					
In	54	0,213	0,733	0,476	0,352 - 1,536
Del	200	0,787			
<b>Total</b>	<b>254</b>				
InIn	5	0,040	0,492	0,749	0,077 - 3,902
InDel	44	0,346	0,848	0,885	0,329 - 2,213
DelDel	78	0,614	1,364	0,618	0,538 - 3,453
<b>Total</b>	<b>127</b>				

<b>Polimorfismo</b>	<b>Idade &gt;50 (n)</b>	<b>Frequência</b>	<b>OR</b>	<b>p</b>	<b>IC</b>
<b>14pb</b>					
In	9	0,450	0,97	1	0,356 - 2,610
Del	11	0,550			
<b>Total</b>	<b>20</b>				
InIn	1	0,100	0,55	0,91	0,025 - 4,625
InDel	7	0,700	1,69	0,68	0,372 - 8,635
DelDel	2	0,200	0,74	1	0,103 - 4,054
<b>Total</b>	<b>10</b>				
<b>322pb</b>					
In	4	0,200	0,867	1	0,236 - 2,897
Del	16	0,800			
<b>Total</b>	<b>20</b>				
InIn	1	0,011	2,537	0,947	0,106 - 26,257
InDel	2	0,023	0,438	0,481	0,062 - 2,352
DelDel	85	0,966	1,592	0,745	0,350 - 0,745
<b>Total</b>	<b>88</b>				

Análise de associação. n= número amostral; OR= *odds ratio*; IC= intervalo de confiança; p= probabilidade. Não foram encontrados valores significativos.

Os dados epidemiológicos relacionados a histórico familiar (Tabela 5) não apresentaram nenhum valor significativo. Se observarmos o número amostral ( $n$ ) dos pacientes com histórico familiar, percebemos que esse valor reduz se comparado com os pacientes sem histórico familiar. Desta forma, as frequências alélicas e genotípicas não apresentaram poder estatístico o suficiente para evidenciar associações. Com uma amostra maior poderíamos conseguir dados mais esclarecedores.

O hábito tabagista (Tabela 6) apresentou um risco para manifestação da doença de duas vezes maior para fumantes comparados com os outros grupos ( $OR=2,637$ ,  $p=0,009$ ,  $IC95\%=1,258-5,584$ ), enquanto que os indivíduos que nunca fumaram apresentaram proteção para o manifestação da doença ( $OR=0,545$ ,  $p=0,047$ ,  $IC95\%=0,298-0,994$ ). Nossos dados, corroborando com estudos anteriores, demonstram que a etiologia da doença não é apenas genética, mas multifatorial, incluindo fatores ambientais como o tabagismo, com as inúmeras substâncias tóxicas existentes no cigarro (aproximadamente 4,7 mil), corroborando com estudos feitos anteriormente (Ministério da Saúde, 2012; Mongey & Hess, 1997 apud Ghaussy *et al.*, 2003; Pyatt & Stillman, 1998; Ghaussy *et al.*, 2003).

Como se pode observar na Tabela 7, o genótipo  $14pb*DelDel$  apresentou proteção para indivíduos que nunca fumaram ( $OR=0,475$ ,  $p=0,043$ ,  $IC95\%=0,229-0,979$ ). Considerando que o genótipo  $14pb*DelDel$  apresentou proteção ( $OR=0,589$ ,  $p=0,046$ ,  $IC95\%=0,349-0,992$ , Tabela 4), talvez a relação genótipo  $14pb*DelDel$  e nunca fumantes seja apenas um reflexo da associação deste genótipo. Essa associação se deve, muito provavelmente, a nossa amostra ser composta em sua maioria por nunca fumantes, assim o resultado encontrado deve estar ligado ao genótipo e não ao hábito tabagista.

Os dados epidemiológicos relacionados à idade de manifestação da doença (Tabela 8) não apresentaram nenhum valor significativo.

### 5.2.3 Desequilíbrio de Ligação

A verificação das probabilidades de segregação independente entre sítios polimórficos foi realizada e dentre os dois sítios polimórficos (14pb da 3'UTR do HLA-G e 322pb da inserção *Alu*yHG), foi observado desequilíbrio de ligação com  $p=0,001$  entre os controles e  $p<0,001$  para o grupo de pacientes. Isso pode apontar a inserção *Alu*yHG

como um importante marcador da região analisada, considerando que existe um desequilíbrio de ligação com o *locus HLA-G*.

#### **5.2.4 Inferência de Haplótipos**

A associação com os haplótipos e composições haplotípicas observadas nos diferentes grupos, caso e controle, e considerando os diferentes fatores de risco (hábito tabagista, histórico familiar e idade de manifestação da doença), estão descritos na Tabela 9. Das dez combinações haplotípicas possíveis, duas não foram encontradas (*3'UTR HLA-G/AluYHG - Del\*Del/In\*In* e *Del\*In/In\*Del*) entre todos os indivíduos tipados.

**Tabela 9.** Haplótipos considerando os polimorfismos 14pb In/Del da 3'UTR do HLA-G e 322pb In/Del da inserção *Alu<sub>y</sub>HG*, para as populações de casos e controles, cálculos de associação (OR) entre os haplótipos e a manifestação de lúpus eritematosos sistêmico, valores de intervalo de confiança (IC 95%) e *p*.

	Haplótipo	Casos (n)	Frequência	Controles (n)	Frequência	OR	<i>p</i>	IC
	Casos x Controles	<b>14pb/322pb</b>						
Del/Del		101	0,439	95	0,448	0,964	0,926	0,651-1,429
In/In		2	0,009	9	0,042	0,198	0,048*	0,029-0,993
Del/In		25	0,109	41	0,194	0,509	0,018*	0,287-0,898
In/Del		102	0,443	67	0,316	1,725	0,008*	1,147-2,595
<b>Total</b>		<b>230</b>		<b>212</b>				
<b>Combinação Haplótipica</b>								
<b>14pb*14pb/322pb*322pb</b>								
DelDel/DelDel		19	0,165	16	0,151	1,113	0,916	0,509-2,440
DelDel/InIn		0	0,000	0	0,000	0,922	1,000	0,025-33,998
DelDel/DelIn	12	0,104	29	0,274	0,309	0,003*	0,139-0,680	
DelDel/InDel	51	0,443	34	0,321	1,688	0,082	0,940-3,036	
InIn/InIn	0	0,000	2	0,019	0,000	0,442	0,480-3,755	
InIn/DelIn	1	0,009	0	0,000	1,861	1,000	0,130-51,917	
InIn/InDel	1	0,009	5	0,047	0,175	0,175	0,007-1,581	
DelIn/DelIn	6	0,052	6	0,057	0,917	1,000	0,252-3,341	
DelIn/InDel	0	0,000	0	0,000	0,922	1,000	0,025-33,998	
InDel/InDel	25	0,217	14	0,132	1,825	0,137	0,846-3,973	
<b>Total de Indivíduos</b>	<b>115</b>		<b>106</b>					

Hábito Tabagista - Fumantes	Haplótipo	Casos (n)	Frequência	Controles (n)	Frequência	OR	p	IC	
	<b>14pb/322pb</b>								
	Del/Del	27	0,540	7	0,318	2,516	0,139	0,782-8,294	
	In/In	0	0,000	2	0,091	0,137	0,172	0,005-1,630	
	Del/In	4	0,080	5	0,227	0,209	0,176	0,057-1,479	
	In/Del	19	0,380	8	0,364	1,073	1,000	0,337-3,445	
	<b>Total</b>	<b>50</b>		<b>22</b>					
	Combinação Haplótipica	Casos (n)	Frequência	Controles (n)	Frequência	OR	p	IC	
	<b>14pb*14pb/322pb*322pb</b>								
	DelDel/DelDel	6	0,240	0	0,000	4,200	0,354	0,411-100,523	
DelDel/InIn	0	0,000	0	0,000	0,462	1,000	0,011-18,725		
DelDel/DelIn	2	0,080	3	0,273	0,232	0,310	0,021-2,201		
DelDel/InDel	13	0,520	4	0,364	1,896	0,614	0,359-10,458		
InIn/InIn	0	0,000	0	0,000	0,462	1,000	0,011-18,725		
InIn/DelIn	0	0,000	0	0,000	0,462	1,000	0,011-18,725		
InIn/InDel	0	0,000	2	0,182	0,103	0,117	0,004-1,400		
DelIn/DelIn	1	0,040	1	0,091	0,417	1,000	0,010-17,206		
DelIn/InDel	0	0,000	0	0,000	0,462	1,000	0,011-18,725		
InDel/InDel	3	0,120	1	0,091	1,364	1,000	0,100-38,200		
<b>Total de Indivíduos</b>	<b>25</b>		<b>11</b>						

	Haplótipo	Casos (n)	Frequência	Controles (n)	Frequência	OR	p	IC
	<b>Hábito Tabagista - Ex-fumante</b>	<b>14pb/322pb</b>						
Del/Del		9	0,450	7	0,318	1,753	0,575	0,419-7,478
In/In		0	0,000	0	0,000	1,095	1,000	0,028-43,270
Del/In		0	0,000	4	0,182	0,181	0,230	0,007-1,885
In/Del		11	0,550	11	0,500	2,000	0,375	0,542-7,517
<b>Total</b>		<b>20</b>		<b>22</b>				
<b>Combinação Haplótipica</b>		<b>Casos (n)</b>	<b>Frequência</b>	<b>Controles (n)</b>	<b>Frequência</b>	<b>OR</b>	<b>p</b>	<b>IC</b>
<b>14pb*14pb/322pb*322pb</b>								
DelDel/DelDel		3	0,300	0	0,000	6,000	0,271	0,453-169,022
DelDel/InIn		0	0,000	0	0,000	1,091	1,000	0,026-46,662
DelDel/DelIn	0	0,000	2	0,182	0,303	0,646	0,010-4,373	
DelDel/InDel	3	0,300	5	0,455	0,514	0,781	0,058-4,291	
InIn/InIn	0	0,000	0	0,000	1,091	1,000	0,026-46,662	
InIn/DelIn	0	0,000	0	0,000	1,091	1,000	0,026-46,662	
InIn/InDel	0	0,000	0	0,000	1,091	1,000	0,026-46,662	
DelIn/DelIn	0	0,000	1	0,091	0,500	1,000	0,015-8,942	
DelIn/InDel	0	0,000	0	0,000	1,091	1,000	0,026-46,662	
InDel/InDel	4	0,400	3	0,273	1,778	0,878	0,204-16,430	
<b>Total de Indivíduos</b>	<b>10</b>		<b>11</b>					

	Haplótipo	Casos (n)	Frequência	Controles (n)	Frequência	OR	p	IC
	<b>Hábito Tabagista - Nunca Fumou</b>	<b>14pb/322pb</b>						
Del/Del		45	0,417	67	0,486	0,757	0,344	0,441-1,298
In/In		1	0,009	7	0,051	0,175	0,145	0,008-1,444
Del/In		13	0,120	26	0,188	0,544	0,145	0,244-1,199
In/Del		49	0,454	38	0,275	2,186	0,006*	1,241-3,856
<b>Total</b>		<b>108</b>		<b>138</b>				
<b>Combinação Haplótipica</b>		<b>Casos (n)</b>	<b>Frequência</b>	<b>Controles (n)</b>	<b>Frequência</b>	<b>OR</b>	<b>p</b>	<b>IC</b>
<b>14pb*14pb/322pb*322pb</b>								
DelDel/DelDel		7	0,130	14	0,203	0,585	0,407	0,194-1,719
DelDel/InIn		0	0,000	0	0,000	1,273	1,000	0,034-47,561
DelDel/DeIn	8	0,148	20	0,290	0,426	0,100	0,154-1,150	
DelDel/InDel	23	0,426	19	0,275	1,952	0,119	0,859-4,458	
InIn/InIn	0	0,000	2	0,029	0,303	0,571	0,012-3,443	
InIn/DelIn	1	0,019	0	0,000	2,593	0,835	0,177-73,354	
InIn/InDel	0	0,000	3	0,043	0,305	0,517	0,013-3,033	
DelIn/DelIn	2	0,037	3	0,043	0,846	1,000	0,095-6,546	
DelIn/InDel	0	0,000	0	0,000	1,273	1,000	0,034-47,561	
InDel/InDel	13	0,241	8	0,116	2,418	0,113	0,840-7,084	
<b>Total de Indivíduos</b>	<b>54</b>		<b>69</b>					



	Haplótipo	Com Histórico (n)	Frequência	Sem Histórico (n)	Frequência	OR	p	IC
	<b>Histórico Familiar</b>	<b>14pb/322pb</b>						
Del/Del		22	0,579	73	0,410	1,978	0,084	0,921-4,270
In/In		0	0,000	1	0,006	2,282	1,000	0,081-33,341
Del/In		5	0,132	20	0,112	1,197	0,955	0,364-3,707
In/Del		11	0,289	84	0,472	0,456	0,060	0,198-1,031
<b>Total</b>		<b>38</b>		<b>178</b>				
<b>Combinação Haplóptica</b>		<b>Com Histórico (n)</b>	<b>Frequência</b>	<b>Sem Histórico (n)</b>	<b>Frequência</b>	<b>OR</b>	<b>p</b>	<b>IC</b>
<b>14pb*14pb/322pb*322pb</b>								
DelDel/DelDel		8	0,421	9	0,101	6,465	0,002*	1,801-23,661
DelDel/InIn		0	0,000	0	0,000	4,500	0,819	0,117-172,962
DelDel/DeIn	1	0,053	0	0,000	9,474	0,160	0,625-276,332	
DelDel/InDel	5	0,263	55	0,618	0,221	0,010*	0,063-0,738	
InIn/InIn	0	0,000	0	0,000	4,500	0,819	0,117-172,962	
InIn/DelIn	0	0,000	1	0,011	2,255	1,000	0,077-33,802	
InIn/InDel	0	0,000	0	0,000	4,500	0,819	0,117-172,962	
DelIn/DelIn	2	0,105	4	0,045	2,500	0,623	0,289-17,984	
DelIn/InDel	0	0,000	0	0,000	4,500	0,819	0,117-172,962	
InDel/InDel	3	0,158	20	0,225	0,647	0,736	0,134-2,716	
<b>Total de Indivíduos</b>	<b>19</b>		<b>89</b>					

Idade de Manifestação - <16 anos	Haplótipo	<16 anos (n)	Frequência	Outros	Frequência	OR	p	IC	
	<b>14pb/322pb</b>								
	Del/Del	8	0,400	93	0,443	0,839	0,894	0,299-2,318	
	In/In	0	0,000	2	0,010	3,317	0,831	0,129-38,632	
	Del/In	6	0,300	19	0,090	4,308	0,013*	1,298-13,914	
	In/Del	6	0,300	96	0,457	0,509	0,265	0,167-1,488	
	<b>Total</b>	<b>20</b>		<b>210</b>					
	Combinação Haplótipica	<16 anos (n)	Frequência	Outros	Frequência	OR	p	IC	
	<b>14pb*14pb/322pb*322pb</b>								
	DelDel/DelDel	0	0,000	19	0,181	0,395	0,621	0,018-3,287	
DelDel/InIn	0	0,000	0	0,000	9,636	0,480	0,243-385,464		
DelDel/DeIn	3	0,300	8	0,076	5,196	0,082	0,861-29,588		
DelDel/InDel	5	0,500	47	0,448	1,234	1,000	0,287-5,306		
InIn/InIn	0	0,000	0	0,000	9,636	0,480	0,243-385,464		
InIn/DelIn	0	0,000	1	0,010	4,773	0,701	0,159-76,984		
InIn/InDel	0	0,000	1	0,010	4,773	0,701	0,159-76,984		
DelIn/DelIn	1	0,100	5	0,048	2,222	1,000	0,090-24,265		
DelIn/InDel	0	0,000	0	0,000	9,636	0,480	0,243-385,464		
InDel/InDel	1	0,100	24	0,229	0,375	0,588	0,017-3,171		
<b>Total de Indivíduos</b>	<b>10</b>		<b>105</b>						

Idade de Manifestação - $\geq 16$ e $\leq 50$ anos	Haplótipo	$\geq 16$ e $\leq 50$ anos (n)	Frequência	Outros	Frequência	OR	p	IC
	<b>14pb/322pb</b>							
	Del/Del	87	0,444	14	0,412	1,140	0,872	0,514-2,543
	In/In	2	0,010	0	0,000	0,538	1,000	0,048-13,610
	Del/In	17	0,087	8	0,235	0,309	0,023*	0,111-0,872
	In/Del	90	0,459	12	0,353	1,557	0,335	0,689-3,556
	<b>Total</b>	<b>196</b>		<b>34</b>				
	Combinação Haplótipica	$\geq 16$ e $\leq 50$ anos (n)	Frequência	Outros	Frequência	OR	p	IC
	<b>14pb*14pb/322pb*322pb</b>							
	DelDel/DelDel	18	0,184	1	0,059	3,600	0,355	0,448-78,489
	DelDel/InIn	0	0,000	0	0,000	0,182	0,725	0,005-7,002
	DelDel/DelIn	8	0,082	3	0,176	0,415	0,435	0,084-2,256
	DelDel/InDel	43	0,439	9	0,529	0,695	0,667	0,221-2,176
	InIn/InIn	0	0,000	0	0,000	0,182	0,725	0,005-7,002
	InIn/DelIn	1	0,010	0	0,000	0,367	0,974	0,024-10,708
	InIn/InDel	1	0,010	0	0,000	0,367	0,974	0,024-10,708
	DelIn/DelIn	4	0,041	2	0,118	0,319	0,469	0,044-2,770
	DelIn/InDel	0	0,000	0	0,000	0,182	0,725	0,005-7,002
	InDel/InDel	23	0,235	2	0,118	2,300	0,446	0,449-15,776
	<b>Total de Indivíduos</b>	<b>98</b>		<b>17</b>				

Idade de Manifestação - >50 anos	Haplótipo	>50 anos (n)	Frequência	Outros	Frequência	OR	p	IC
	<b>14pb/322pb</b>							
	Del/Del	6	0,429	95	0,440	0,995	1,000	0,283-3,164
	In/In	0	0,000	2	0,009	4,778	0,650	0,183-57,571
	Del/In	2	0,143	23	0,106	1,399	1,000	0,203-7,263
	In/Del	6	0,429	96	0,444	0,938	1,000	0,277-3,107
	<b>Total</b>	<b>14</b>		<b>216</b>				
Idade de Manifestação - >50 anos	Combinação Haplótipica	>50 anos (n)	Frequência	Outros	Frequência	OR	p	IC
	<b>14pb*14pb/322pb*322pb</b>							
	DelDel/DelDel	1	0,143	18	0,168	0,833	1,000	0,035-7,836
	DelDel/InIn	0	0,000	0	0,000	13,625	0,347	0,333-564-817
	DelDel/DelIn	0	0,000	11	0,102	1,021	1,000	0,043-9,476
	DelDel/InDel	4	0,571	48	0,444	1,667	0,793	0,295-9,963
	InIn/InIn	0	0,000	0	0,000	13,625	0,347	0,333-564-817
	InIn/DelIn	0	0,000	1	0,009	6,750	0,545	0,218-114,921
	InIn/InDel	0	0,000	1	0,009	6,750	0,545	0,218-114,921
	DelIn/DelIn	1	0,143	5	0,046	3,433	0,813	0,133-41,425
	DelIn/InDel	0	0,000	0	0,000	13,625	0,347	0,333-564-817
	InDel/InDel	1	0,143	24	0,222	0,583	0,984	0,025-5,348
	<b>Total de Indivíduos</b>	<b>7</b>		<b>108</b>				

Análise de associação. n= número amostral; OR= odds ratio; IC= intervalo de confiança; p= probabilidade. Os valores significativos estão anotados com \*.

Quando a análise de associação foi feita considerando os diferentes haplótipos com a manifestação de LES, foram encontrados resultados significativos para a presença de (ler na sequência: \*14pb/\*322pb) \*In/\*In (OR=0,198,  $p=0,048$ , IC95%=0,029-0,993), \*Del/\*In (OR=0,509,  $p=0,018$ , IC95%=0,287-0,898), ambos associados à proteção, e \*In/\*Del (OR=1,725,  $p=0,008$ , IC95%=1,147-2,595), associado ao risco. As famílias de elementos móveis *Alu*, entre outras, ainda estão duplicando, gerando variação entre genomas individuais (Stewart *et al.*, 2011). Com essa afirmação, podemos levantar a hipótese de que a população estudada talvez não tenha tido tempo o suficiente para entrar em equilíbrio em relação à inserção *Alu*/*HG*, demonstrando resultados que podem estar sob influência de uma estruturação populacional, necessitando de mais gerações para se estabilizar. Com mais estudos sobre as funções das inserções *Alu* e seu desequilíbrio de ligação com o *HLA-G* poderemos levantar hipóteses mais fundamentadas.

Na composição haplotípica, foi encontrado resultado significativo para a presença de (ler na sequência: 14pb\*322pb/14pb\*322pb) \*Del\*Del/\*Del\*In (OR=0,309,  $p=0,003$ , IC95%=0,139-0,680), associado com proteção na manifestação da doença. Esta proteção da combinação haplotípica pode estar relacionada ao genótipo 14pb\*Del\*Del, que também conferiu proteção (OR=0,589,  $p=0,046$ , IC95%=0,349-0,992).

Ao considerar o dado epidemiológico tabagismo, houve associação significativa entre o grupo de indivíduos que nunca fumaram com o haplótipo \*In/\*Del (OR=2,189;  $p=0,006$ , IC95%=1,241-3,856). Como a frequência deste haplótipo também apresentou associação na análise genotípica (OR=1,725,  $p=0,008$ , IC95%=1,241-3,856), podemos supor que, novamente, esse dado é um reflexo da associação do genótipo, podendo ser uma associação espúria com o hábito tabagista, lembrando que o hábito de nunca ter fumado conferiu proteção aos indivíduos.

O histórico familiar apresentou associação com as composições haplotípicas \*Del\*Del/Del\*Del (OR=6,465,  $p=0,002$ , IC95%=1,801-23,661) e Del\*Del/\*In\*Del (OR=0,221,  $p=0,010$ , IC95%=0,063-0,738). Ter histórico familiar e ser homocigoto \*Del para ambos os loci apresentou risco de seis vezes mais chances de manifestar a doença. A deleção do fragmento de 14pb do *HLA-G*, pode resultar em uma menor expressão do gene, e assim estar associada à manifestação da doença.

Isto porque a molécula HLA-G aumenta a imunotolerância do organismo, pois tem a capacidade de inibir, por exemplo, as funções citolíticas antígenos-específicas das células T CD8, assim como as respostas aloproliferativas das células T-CD4, a produção de citocinas por células T (Donadi *et al.*, 2011), células sabidamente associadas a manifestação do LES (Suh & Kim, 2008; Tsokos, 2011).

Considerando a idade de manifestação da doença, o haplótipo *\*Del/\*In* apresentou associação de risco significativa no grupo que apresentou manifestação da doença antes dos 16 anos (OR=4,308,  $p=0,013$ , IC95%=1,298-13,914) e de proteção o grupo com manifestação entre os 16 e 50 anos (OR=0,309,  $p=0,023$ , IC95%=0,111-0,872). Desta forma este haplótipo (*\*Del/\*In*) parece ter uma associação com a manifestação precoce da doença. Mas este mesmo haplótipo apresentou associação de proteção quando nenhum dado epidemiológico foi considerado. Assim, o fato de ter sido relacionado com proteção no grupo com diagnóstico nas idades entre 16 e 50 anos pode se dever ao elevado número de pacientes contidos neste grupo (98 dos 115 pacientes, ou seja, 85% desses indivíduos).

Os outros grupos analisados não supracitados não apresentaram associações significativas.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados obtidos e análises realizadas, podemos concluir que:

- As técnicas para genotipagem do polimorfismo *Alu*yHG foram otimizadas;
- Após as análises, foram encontradas proteção na manifestação da doença para o polimorfismo de 14pb e seu genótipo *\*Del\*Del*, assim como para nunca fumantes e o genótipo *\*Del\*Del*;
- Em relação ao polimorfismo de *Alu*yHG (322pb), foi encontrada associação para o genótipo *\*Del\*Del* e a manifestação da doença;
- Entre os dados epidemiológicos, o hábito tabagista foi associado à doença entre o grupo de fumantes e nunca ter fumado conferiu proteção para a manifestação da doença;
- Considerando os haplótipos inferidos, foi encontrada associação para a manifestação da doença no haplótipo *14pb\*In/322pb\*Del* e proteção para os haplótipos *14pb\*In/322pb\*In* e *14pb\*Del/322pb\*In*. No grupo de nunca fumantes, o haplótipo *14pb\*In/322pb\*Del* conferiu susceptibilidade para a manifestação da doença. Indivíduos que manifestaram a doença antes dos 16 anos apresentaram associação para a manifestação da doença quando com o haplótipo *14pb\*Del/322pb\*In*, enquanto os indivíduos que manifestaram a doença entre os 16 e 50 anos apresentaram proteção para o mesmo haplótipo;
- Nas composições haplotípicas, foi encontrado proteção para a manifestação de LES em *14pb\*Del\*Del/322pb\*Del\*In*. Entre os indivíduos com histórico familiar da doença, a composição haplotípica *14pb\*Del\*Del/322pb\*Del\*Del* conferiu seis vezes mais chances de desenvolver a doença, enquanto a composição haplotípica *14pb\*Del\*In/322pb\*Del\*In* conferiu proteção para esse mesmo grupo;
- Foi encontrado desequilíbrio de ligação entre os dois polimorfismos, tanto no grupo de pacientes quanto no grupo de controles, demonstrando que esses não segregam independentemente, podendo o polimorfismo *Alu*yHG ser um bom marcador para a região;

- Outros estudos de associação para os polimorfismos Alu<sub>Y</sub>HG e HLA-G devem ser realizados com Lúpus Eritematoso Sistêmico de forma a esclarecer melhor os padrões de ligação dessa região genômica, auxiliando na busca de marcadores para a região e para a doença.



**7 REFERÊNCIAS**

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Editora Elsevier Ltda., 7ª edição, 2011.
- AGUADO, B.; BAHRAM, S.; BECK, S.; CAMPBELL, R. D.; FORBES, S. A.; GERAGHTY, D.; GUILLAUMEUX, T.; *et al.* Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, v. 401, p. 921–923, 1999.
- BACK, L. K. C. *Lúpus Eritematoso Sistêmico: Pesquisa de Marcadores Moleculares de Susceptibilidade e Prognóstico*. Florianópolis, 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2007.
- BAE, S.C.; FRASER, P.; LIANG, M.H. The epidemiology of systemic lupus erythematosus in populations of African ancestry: a critical review of the "prevalence gradient hypothesis." *Arthritis Rheumatology*, v. 41, p. 2091-2099, 1998.
- BATZER, M. A.; DEININGER, P. L. A human-specific subfamily of Alu sequences. *Genomics*, v. 9, p. 481- 487, 1991.
- BATZER, M. A.; STONEKING, M.; ALEGRIA-HARTMAN, M.; BAZAN, H.; KASS, D. H.; SHAIKH, T. H.; NOVICK, G. E.; IOANNOU, P. A.; SCHEER, D. W.; HERRERA, R. J.; DEININGER, P. L. African origin of human-specific Alu insertions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 91, p. 12288-12292, 1994.
- BATZER, M. A.; DEININGER, P. L. Alu repeats and human genomic diversity. *Nature Reviews Genetics*, v. 3, p. 370-379, 2002.
- BERNKNOPF, B.A.; ROWLEY, K.; BAILEY, T. A review of systemic lupus erythematosus and current treatment options. *Formular Journal*, v. 46, p.178-194, 2012.
- BONGU, A.; CHANG, E.; RAMSEY, GOLDMAN, R. Can morbidity and mortality of SLE be improved? *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, v. 16, p. 313-332, 2002.

BRAUN-PRADO, K. Estudo do polimorfismo dos genes *IL4*, *IL13* e *PDCDI* e investigação de possíveis interações gênicas no pênfigo foliáceo endêmico. Curitiba, 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, UFPR, Programa de Pós-Graduação Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2006.

BRENOL, C. V.; VEIT, T. D.; CHIES, J. A. B.; XAVIER, R. M. O papel do gene e da molécula HLA-G na expressão clínica das doenças reumatológicas. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 52, p. 75-91, 2012.

CAMBRIDGE JOURNALS. Gene map of the human leukocyte antigen (HLA) region. *Expert reviews in molecular medicine*, v. 5, 2003.

CAMPBELL, E. C.; ANTONIOU, A. N.; POWIS, S. J. The multifaceted nature of HLA class I dimer molecules. *Immunology*, v. 136, p. 380-4, 2012.

CAPY, P.; BAZIN, D.C.; LANGIN, T. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity*, v. 85, p. 101-106, 1998.

CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P.; LEMAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends in immunology*, v. 29, p. 125-132, 2008.

CAROSELLA, E.; GREGORI, S.; ROUAS-FREISS, N.; LEMAOULT, J.; MENIER, C.; FAVIER, B. The role of HLA-G in immunity and hematopoiesis. *Cellular and molecular life sciences*, v. 68, p. 353-368, 2011.

CASTELLI, E. C.; MENDES-JUNIOR, C. T.; DEGHAIDE, N. H.; DE ALBUQUERQUE, R. S.; MUNIZ, Y. C.; SIMÕES, R. T.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P.; DONADI, E. A. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes and immunity*, v. 11, p. 134-41, 2010.

- CASTELLI, E. C.; MENDES-JUNIOR, C. T.; VEIGA-CASTELLI, L. C.; ROGER, M.; MOREAU, P.; DONADI, E. A. Research article a comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28, p. 3069–3086, 2011.
- CONSIGLIO, C. R.; VEIT1, T. D.; MONTICIELOO. A.; MUCENIC, T.; XAVIER, R. M.; BRENOL, J. C. T.; CHIESJ. A. B. Association of the HLA-G gene +3142C>G polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*, v. 77, p. 540-545, 2011.
- CORDEAUX, R.; SRIKANTA, D.; LEE, J.; STONEKING, M.; BATZER, M. A. In search of polymorphic Alu insertions with restricted geographic distributions. *Genomics*, v. 90, p. 154-158, 2007.
- CRISPÍN, J. C.; OUKKA, M.; BAYLISS, G.; COHEN, R. A.; VAN-BEEK, C. A.; STILLMAN, I. E.; KYTTARIS, V. C.; JUANG, Y-T.; TSOKOS, G. C. Expanded Double Negative T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Produce IL-17 and Infiltrate the Kidneys. *The Journal of Immunology*, v. 181, p. 8761–8766, 2008.
- DAWKINS, R.; LEELAYUWAT, C.; GAUDIERI, S.; TAY, G.; HUI, J.; CATTLEY, S.; MARTINEZ, P.; KULSKI, J. Genomics of the major histocompatibility complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease. *Immunology Review*, v. 167, p. 275–304, 1999.
- DONADI, E. A.; CASTELLI, E. C.; ARNAIZ-VILLENA, A.; ROGER, M.; REY, D.; MOREAU, P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cellular and molecular life sciences*, v. 68, p. 369-395, 2011.
- GARCÍA-OBREGÓN, S.; ALFONSO-SÁNCHEZ, M. A.; PÉREZ-MIRANDA, A. M.; GÓMEZ-PÉREZ, L.; DE PARCORBO, M. M.; PEÑA, J. A. Ancestry markers from the human chromosome 6: Alu repeats from the MHC in autochthonous Basques. *Human Immunology*, v. 73, p. 720-725, 2012.

GHAUSSY, N.O.; SIBBIT, W.; BANKHURST, A.D.; QUALLS, C.R. Cigarette smoking and disease activity in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology*, v. 30, p. 1215-1221, 2003.

GÓMEZ-PÉREZ, L.; ALFONSO-SÁNCHEZ, M. A.; SÁNCHEZ, D.; GARCÍA-OBREGÓN, S.; ESPINOSA, I.; MARTÍNEZ-JARRETA, B.; *et al.* Alu polymorphism in the Waorani Tribe from the Ecuadorian Amazon reflect the effects of isolation and genetic drift. *American Journal of Human Biology*, v. 23, p. 790-795, 2011.

GRAHAM, R. R., ORTMANN, W. A, LANGEFELD, C. D., JAWAHEER, D., SELBY, S. A, RODINE, P. R., BAECHLER, E. C., ROHLF, K. E.; SHARK, K. B.; ESPE, K. J.; GREEN, L. E.; NAIR, R. P.; STUART, P. E.; ELDER, J. T.; KING, R. A.; MOSER, K. L.; GAFFNEY, P. M.; BUGAWAN, T. L.; ERLICH, H.A.; RICH, S. S.; GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W. Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *American journal of human genetics*, v. 73, p. 543–553, 2002.

GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W. Genetics of autoimmune diseases: disorders of immune homeostasis. *Nat Rev Gen*, v. 7, p.917-928, 2006.

HEALTH DECISION STRATEGIES. EpiMax Table Calculator. Disponível em : <<http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm>>. Acesso em: novembro de 2012.

HORTON, R.; WILMING, L.; RAND, V.; LOVERING, R. C.; BRUFORD, E. A.; KHODIYAR, V. K.; LUSH, M. J.; POVEY, S.; TALBOT, C. C. JR.; WRIGHT, M. W.; WAIN, H. M.; TROWSDALE, J.; ZIEGLER, A.; BECK, S. Gene map of the extended human MHC. *Nature reviews. Genetics*, v. 5, p. 889-899, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Primeiros resultados do Censo 2010: Censo 2010 em Santa Catarina, 2010. 11p. Fonte: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acessado em: outubro de 2011.

INVERNIZZI, P.; GERSHWIN, M. E. The genetics of human autoimmune disease. *J Autoimmun*, v. 33, p.290-299, 2009.

ISENBERG, D.; MANZI, S. *Lupus*. Editora Oxford University Press, 2ª edição, 2008.

JOHN, S. W.; WEITZNER, G.; ROZEN, R. *et al.* A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic acids research*, v. 19, n. 2, p. 408, 1991.

JUANG, Y-T.; WANG, Y.; SOLOMOU, E. E.; LI, Y.; MAWRIN, C.; TENBROCK, K.; KYTTARIS, V.C.; GEORGE C. TSOKOS, G. C. Systemic lupus erythematosus serum IgG increases CREM binding to the IL-2 promoter and suppresses IL-2 production through CaMKIV. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 115, p. 996–1005, 2005.

KELLY, J. A.; MOSER, K. L.; HARLEY, J. B. The genetics of systemic lupus erythematosus: putting the pieces together. *Genes and Immunity*, v. 3, p. S71-S85, 2002.

KRIEGS, J. O.; CHURAKOV, G.; JURKA, J.; BROSIUS, J.; SCHMITZ, J. Evolutionary history of 7SL RNA-derived SINEs in Supraprimates. *Trends Genetcis*, v. 23, p. 158–161, 2007

KULSKI, J. K.; GAUDIERI, S.; MARTIN, A.; DAWKINS, R. L. Coevolution of PERB11 (MIC) and HLA class I genes with HERV-16 and retro- elements by extended genomic duplication. *Journal of Molecular Evolution*, v. 49, p. 84–97, 1999.

KULSKI, J. K.; MARTINEZ, P.; LONGMAN-JACOBSEN, N.; WANG, W.; WILLIAMSON, J.; DAWKINS, R. L.; SHIINA, T.; NARUSE, T.; INOKO, H. The association between HLA-A alleles and an Alu dimorphism near HLA-G. *Journal of Molecular Evolution*, v. 53, p. 114-123, 2001.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic acids research*, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M. C.; BALDWIN, J.; *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, v. 409, p. 860-921, 2001.

LARSEN, M.; HVIID, T. Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. *Human immunology*, v. 70, p. 1026-34, 2009.

LEWIN B (2009). *Genes IX*. Editora Artmed Porto Alegre 900p.

MENIER, C.; ROUAS-FREISS, N.; FAVIER, B.; LEMAULT, J.; MOREAU, P.; CAROSELLA, E. D. Recent advances on the non-classical major histocompatibility complex class I HLA-G molecule. *Tissue antigens*, v. 75, p. 201-206, 2010.

MIAH, T; HOQUE, M.A.; MAHMOOD, T.; TARAFDER, B.K. Clinical profile, management and outcome of lupus. *Mymensingh Medical Journal*, v. 17, p. S6-11, 2008.

MILLS, R. E.; BENNETT, E. A.; ISKOW, R. C.; DEVINE, S. E. Which transposable elements are active in the human genome? *Trends Genet*, v. 23, p. 183–191, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Tabagismo: Você sabia? Fonte: <<http://www.saude.gov.br>>. Acessado em: 09 de novembro de 2012.

MONGEY, A.B.; HESS, E.V. The role of environment in SLE and associated disorders. Dubois' lupus erythematosus. Editora Baltimore: Williams and Wilkins, 5ª edição, 1997.

MOREAU, P.; FLAJOLLET, S.; CAROSELLA, E. D. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 13, p. 2973-2989, 2009.

MOULTON, V.R. & TSOKOS, G.C. Why do women get lupus? *Clinical immunology*, v. 144, p. 53-56, 2012.

PARHAM, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nature reviews. Immunology*, v. 5, p. 201-214, 2005.

PYATT, D.W.; STILLMAN, W.S.; IRONS, R.D. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, inhibits NF-kappa B in primary human CD4+ T lymphocytes. *Toxicology Applied Pharmacology*, v. 84, p. 149-178, 1998.

PONS-ESTEL, G.J; ALARÇÓN, G.S.; SCOFIELD, L.; REINLIB, L.; COOPER, G.S. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v. 39, p. 257-268, 2010.

RHEAD, B.; KAROLCHIK, D.; KUHN, R. M.; HINRICHS, A. S.; ZWEIG, A. S.; FUJITA, P. A.; DIEKHANS, M.; SMITH, K. E.; ROSENBLUM, K. R.; RANEY, B. J.; POHL, A.; PHEASANT, M.; MEYER, L. R.; LEARNED, K.; HSU, F.; HILLMAN-JACKSON, J.; HARTE, R. A.; GIARDINE, B.; DRESZER, T. R.; HIRAM CLAWSON, H.; BARBER, G. P.; HAUSSLER, D.; KENT, W. J. The UCSC Genome Browser database: update 2010. *Nucleic Acids Research*, v. 38, p. D613–619, 2010.

RHODES, D. A.; TROWSDALE, J. Genetics and molecular genetics of the MHC. *Review Immunogenetics*, v. 1, p. 21–31, 1999.

RIZZO, R.; HVIID, T. V. F.; GOVONI, M.; PADOVAN, M.; RUBINI, M.; MELCHIORRI, L.; STIGNANI, M.; CARTURAN, S.; GRAPPA, M. T.; FOTINIDI, M.; FERRETTI, S.; VOSS, A.; LAUSTRUP, H.; JUNKER, P.; TROTTA, F.; BARICORDI, O. R. HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. *Tissue antigens*, v. 71, p. 520–529, 2008.

RIZZO, R.; BORTOLOTTI, D.; BEN FREDJ, N.; ROTOLA, A.; CURA, F.; CASTELLAZZI, M.; TAMBORINO, C.; SERACENI, S.; BALDI, E.; MELCHIORRI, L.; TOLA, M. R.; GRANIERI, E.; R. BARICORDI, O. R.; FAINARDI, E.. Role of HLA-G 14bp deletion/insertion and +3142C>G polymorphisms in the production of

sHLA-G molecules in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Human immunology*, v.73, p. 5-11, 2012.

ROSADO, S.; PEREZ-CHACON, G.; MELLOR-PITA, S.; SANCHEZ-VEGAZO, I.; BELLAS-MENENDEZ, C.; CITORES, M. J. *et al.* Expression of human leukocyte antigen-G in systemic lupus erythematosus. *Human Immunology*, v. 69, p. 9-15, 2008.

ROUSSET, F.; RAYMOND M. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics*, v. 140, p. 1413-1419, 1995.

ROUSSEAU, P.; DISCORDE, M. LE; MOUILLOT, G.; MARCOU, C.; CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P. The 14 bp Deletion-Insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Human Immunology*, v. 64, p. 1005-1010, 2003.

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA (SBR). Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES): Orientação ao Paciente. Comissão de Lúpus, 2011.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics*, v. 68, p. 978-989, 2001.

STEPHENS, M.; SCHEET, P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *The American Journal of Human Genetics*, v. 76, p. 449-462, 2005.

STEWART, C.; KURAL, D.; STRÖMBERG, M.; WALKER, J.; KONKEL, M.; STÜTZ, A.; URBAN, A.; GRUBERT, F.; LAM, H. Y. K.; LEE, W.-P.; BUSBY, M.; INDAP, A. R.; GARRISON, E.; HUFF, C.; XING, J.; SNYDER, M.; JORDE, L. B.; BATZER, M.; KORBEL, J. A Comprehensive Map of Mobile Element Insertion Polymorphisms in Humans. *Plos Genetics*, v. 7, p.1-19, 2011.



SUH, C-H.; KIM, H-A. Cytokines and their receptors as biomarkers of systemic lupus erythematosus. *Expert Reviews of Molecular Diagnostic*, v. 2, p. 189-198, 2008.

TAN, E. M.; COHEN, A. S.; FRIES, J. F.; MASI, A. M.; MCSHANE, D. J.; ROTHFIELD, N. F.; SCHALLER, J. G.; TALAL, N.; WINCHESTER, R. J. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, v. 25, p. 1271-1277, 1982.

TERREROS, M. C.; ALFONSO-SÁNCHEZ, M. A.; NOVICK, G. E.; LUIS, J. R.; LACAU, H.; LOWERY, R.K.; *et al.* Insights on human evolution: an analysis of Alu insertion polymorphisms. *Journal of Human Genetics*, v. 54, p. 603-611, 2009.

TSOKOS, G.C.; GORDON, C.; SMOLEN, J. S. *Systemic Lupus Erythematosus: A Companion to Rheumatology*. Editora Mosby Elsevier, 1ª edição, 2007.

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

ULLU, E. & TSCHIDI, C. Alu sequences are processed 7SL RNA genes. *Nature*, v. 8, p. 171-172, 1984.

VEIT, T. D.; CORDERO, E. A.; MUCENIC, T.; MONTICIELO, O. A.; BRENOL, J. C.; XAVIER, R. M.; *et al.* Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, v. 18, p. 424-430, 2009.

WITHERSPOON, D. J.; MARCHANI, E. E.; WATKINS, W. S.; OSTLER, C. T.; WOODING, S. P.; ANDERS, B.; FOWLKES, J. D.; BOISSINOT, S.; FURANO, V.; RAY, D.; ROGERS, R.; BATZER, M.; JORDE, L. B. Human population genetic structure and diversity inferred from polymorphic L1(LINE-1) and Alu insertions. *Human Heredity*, v. 62, p. 30-46, 2006.

ZHOU, Y.; YUAN, J.; PAN, Y.; FEI, Y.; QIU, X.; HU, N.; LUO, Y.; LEI, W.; LI, Y.; LONG, H.; SAWALHA, A. H.; RICHARDSON, B.; LU, Q. T cell CD40LG gene expression and the production of IgG by autologous B cells in systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology*, v. 132, p. 362–370, 2009.

ANEXO A – Termo De Consentimento Livre E Esclarecido pacientes



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

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ECLARECIDO**

Informações aos participantes,

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

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

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

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO**

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

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

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

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

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



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



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### Projetos de Pesquisa:

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

e

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

#### ***Informações:***

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

#### ***Procedimentos:***

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

Também precisaremos tirar um pouco de sangue numa seringa.

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

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

**Riscos:**

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

**Custos:**

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo.

**Benefícios**

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

**Assinaturas:**

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

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

---

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO**

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

Florianópolis,

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

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

## ANEXO C – Questionário pacientes



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

**NOME:** \_\_\_\_\_ **PRONTuário/HU:** \_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

**Médico:** \_\_\_\_\_

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

**DADOS Familiares:**

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

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

**DESCENDência:** Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

**NOME da mãe:** \_\_\_\_\_

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

**DESCENDência:** Materna \_\_\_\_\_ Paterna \_\_\_\_\_

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

**HISTória FAMiliar:** Lúpus: ( )S ( )N Parentesco: \_\_\_\_\_

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

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

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

---

---

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

---

---

**SOBREPosição com alguma  
outra doença reumatológica:**

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

**OBServações:** diabetes? Depressão?

---

---

---

**SINTomatologia RECente:**

(últimos 10 dias)

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

**Tratamento Atual:**

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

Dose?\_\_\_\_\_ Freqüência?\_\_\_\_\_

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

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

Dose?\_\_\_\_\_ Freqüência?\_\_\_\_\_

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

( )Climatério

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

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

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

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

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

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

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

Se fumava, qual a duração? \_\_\_\_\_

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

Algum familiar ou amigo próximo é fumante?

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

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

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

Avaliação Global do Médico \_\_\_\_\_

0      1      2      3  
 Nula   Leve   Média   Severa

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

**Score SLEDAI**

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

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

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

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

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

<b>Crise Leve ou Moderada ( )</b>	<b>Severa ( )</b>
( ) Mudança no SLEDAI >3 pontos	( ) Mudança no SLEDAI >12 pontos
( ) Úlceras nasofaríngeas Pleurite Pericardite Artrite Febre (LES) Lupus bolhoso, vasculite cutânea, profunda, fotossensível e discóide recente/pior	( ) SNC-LES recente ou pior Vasculite (????) Nefrite Miosite Pk<60.000 Hb<7% ou diminuição na HB>3% Precisando de prednisona em dobro
( ) Aumento na prednisona, mas não para mais que 0,5 mg/kg/dia	( ) Prednisona>0,5 mg/kg/dia
( ) Adicionado AINE ou Plaquenil	( ) Necessidade de Azatioprina, Metotrexato ou Hospitalização pelo LES
( ) Aumento na PGA maior ou igual a 1 mas não maior que 2,5	( ) Aumento no PGA para mais de 2,5

## ANEXO D – Questionário controles



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

**QUESTIONÁRIO – GRUPO CONTROLE**

## IDENTIFICAÇÃO

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

**Dados Pessoais:**

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

Endereço: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

Escolaridade: ( ) analfabeto ( ) 1º grau incompleto

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

( ) 2º grau completo ( ) superior incompleto

( ) superior completo ( ) pós graduação

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

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

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

Etnia: ( ) Euro descendente ( ) Afro descendente

( ) Asiático descendente ( ) Indígena descendente

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

Observação: \_\_\_\_\_

**Dados Familiares:**

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

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

Ascendência do pai:

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

Profissão: \_\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

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

Descendência da mãe:

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

Profissão: \_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

Que tipo de bebida alcoólica ingere mais frequentemente?

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

Que tipo de bebida alcoólica nunca ingere?

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Há quanto tempo parou: \_\_\_\_\_

### Histórico Hormonal e Reprodutivo

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

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

HISTERECTOMIA: ( ) Sim ( ) Não

PARIDADE:

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

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

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

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

#### TRAT. HORMONAL:

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

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

\_\_\_\_\_

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

Há quanto tempo parou? \_\_\_\_\_

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

Nome do Hormônio: \_\_\_\_\_

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

Há quanto tempo parou? \_\_\_\_\_

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

Observações: \_\_\_\_\_

---

#### Histórico Médico

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

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

\_\_\_\_\_

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

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

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

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

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

\_\_\_\_\_

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

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



---

---

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

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

---

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

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

---

Tempo de diagnóstico: \_\_\_\_\_

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

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

---

---

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

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

---

---

**HIPERTENSÃO ARTERIAL**: ( )Sim ( ) Não

**HIPERCOLESTEROLEMIA**: ( )Sim ( ) Não

**OSTEOPOROSE**: ( )Sim ( ) Não

**DOENÇA REUMÁTICA**: ( )Sim ( ) Não

**DIABETES**: ( )Sim ( ) Não

**ASMA**: ( )Sim ( ) Não

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

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

**DENGUE**: ( )Sim ( ) Não

**TUBERCULOSE**: ( )Sim ( ) Não

**DISTÚRPIO RENAL**: ( )Sim ( ) Não

**DISTÚRPIO PULMONAR**: ( )Sim ( ) Não

**DISTÚRPIO HEPÁTICO**: ( )Sim ( ) Não

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

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

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

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

OUTRAS DOENÇAS?: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_

Alérgico a algum alimento? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Teve DEPRESSÃO? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

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

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

\_\_\_\_\_