

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA**

**RECEPTOR DE QUIMIOCINA CCR5 E A SUSCETIBILIDADE
AO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

JOÃO ADALBERTO MARASCA

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO CARLOS TAVARES BRENOL

**CO-ORIENTADORES: PROF. DR. RICARDO MACHADO XAVIER
PROF. DR. JOSÉ ARTUR BOGO CHIES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

- 2002 -

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA**

**RECEPTOR DE QUIMIOCINA CCR5 E A SUSCETIBILIDADE
AO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

JOÃO ADALBERTO MARASCA

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO CARLOS TAVARES BRENOL

**CO-ORIENTADORES: PROF. DR. RICARDO MACHADO XAVIER
PROF. DR. JOSÉ ARTUR BOGO CHIES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

- 2002 -

Ao meu pai,

João Baptista Marasca, pelo exemplo de honestidade, coragem e garra.

À minha mãe,

Elsa Bavaresco Marasca, pelo constante estímulo ao estudo e ao aprendizado.

Ao meu irmão,

João Luís Marasca, a quem cresci admirando pela inteligência, dedicação aos estudos, amizade e camaradagem; também um exemplo de luta.

“In memoriam”

“Embora não possamos voltar atrás e
fazer um novo começo,
podemos começar agora e fazer um novo fim”.

Ayrton Senna da Silva

AGRADECIMENTOS

- Aos meus colegas do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Departamento de Genética da UFRGS pelo apoio e auxílio sempre prestosos.

- Ao Prof. Dr. João Carlos Tavares Brenol pelo exemplo de vida e de profissional, constante estímulo ao aprimoramento profissional e intelectual, fundamental apoio na redação da dissertação e, principalmente, pelo carinho e amizade.

- Ao Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier pelo estímulo ao método científico, busca de evidências, redação dos artigos e exemplo de dedicação ao trabalho científico.

- Ao Prof. Dr. José Artur Bogo Chies pelo constante apoio junto ao laboratório de genética e pelo auxílio na redação dos artigos.

- Ao colega e amigo Markus Bredemeier pelo importante auxílio nas análises estatísticas.

- À Cristiane Dresh, farmacêutica e mestranda pelo companheirismo e ajuda no trabalho laboratorial.

INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica, multissistêmica, de etiologia desconhecida, caracterizada basicamente por arterite de vasos de pequeno e médio calibre (1). “Trata-se de uma doença que pode virtualmente apresentar qualquer manifestação clínica, com uma complexidade que apaixona o médico, mas também o desnorreia” (2).

O LES é uma doença auto-imune caracterizada por uma desordem na resposta imune humoral e celular que leva a produção de auto-anticorpos (3). Estes auto-anticorpos, geralmente direcionados contra o núcleo da célula, podem determinar lesões em diferentes órgãos e sistemas, variando de paciente para paciente. As variáveis expressões clínicas estão relacionadas com diferentes fatores: genéticos, ambientais, hormonais e imunológicos (4). Um dos principais desafios para o melhor conhecimento da etiopatogenia do LES é a melhor identificação das relações entre suscetibilidade genética e a expressão da doença.

Os processos inflamatórios, como a sinovite reumatóide e glomerulonefrite auto-imune, cursam com importante mobilização de leucócitos estimulados pelas quimiocinas. Estas substâncias agem sobre a função celular através de receptores de quimiocinas transmembrana (5). O receptor de quimiocina beta CCR5 pertence à super família da proteína ligante GTP heterotrimérica (proteína G) (6). É o maior receptor celular das quimiocinas RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β , sendo também um eficiente co-receptor para o vírus do HIV-1 com tropismo por macrófagos (7). Sua expressão é mais comum entre certos tipos celulares, especificamente linfócitos Th1 e macrófagos, levando a uma resposta imune do tipo Th1 (8). A variante polimórfica CCR5 Δ 32 apresenta uma deleção de 32 pb que provoca a produção de uma proteína truncada e completa perda do

receptor na superfície celular, nos indivíduos homozigotos. O alelo CCR5 Δ 32 tem sido estudado e sua frequência varia de zero em populações não caucasóides até aproximadamente 14% em certas populações européias. Os indivíduos homozigotos para CCR5 Δ 32 são relativamente resistentes à infecção pelo vírus HIV-1 com tropismo por macrófagos (9, 10). Há evidências que a perda da expressão do CCR5 poderia afetar certas respostas inflamatórias, resultando em proteção contra o surgimento e severidade de certas condições inflamatórias como a artrite reumatóide (11, 12).

O CCR5 foi associado à patogênese da nefrite lúpica em um modelo animal (13). Mostrou-se que macrófagos CCR5 ativados e células T se acumularam nas lesões intersticiais e glomerulares da nefrite lúpica, indicando um possível importante papel deste receptor de quimiocina nesta expressão da doença (14). A potencial proteção contra condições inflamatórias relacionadas à presença do alelo CCR5 Δ 32, suscitou a hipótese desta variante estar associada a uma menor suscetibilidade genética para o desencadeamento do LES, em especial em pacientes com nefrite lúpica.

Recentes avanços no diagnóstico e manejo dos pacientes com LES têm melhorado substancialmente o prognóstico dos pacientes com LES. As taxas de morbidade e mortalidade têm diminuído; entretanto, muito ainda precisa ser feito para se elucidar a patogênese do LES e proporcionar uma melhor qualidade de vida aos pacientes lúpicos.

REVISÃO DA LITERATURA

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença multissistêmica que causa dano tecidual como resultado da ação de anticorpos e depósitos de imunocomplexos. É uma doença inflamatória crônica, caracterizada basicamente pela arterite de vasos de pequeno e médio calibre. Há um grande espectro de apresentações clínicas, com evolução caracterizada por remissões e exacerbações. As alterações imunológicas, com as conseqüentes manifestações clínicas, estão associadas à suscetibilidade genética e fatores ambientais (irradiações, infecções, medicamentos...) (1).

O diagnóstico do LES obedece aos critérios da ACR (*American College of Rheumatology*), criados em 1971 e atualizados em 1982 com base em estudos epidemiológicos (15, 16). Em 1997 houve a inclusão dos anticorpos antifosfolípide nos critérios diagnósticos (apêndice 1) (17).

Um marcante aumento na incidência do LES foi registrado desde a clássica descrição da célula LE por Hargraves em 1948 (18) e da primeira identificação de auto-anticorpo contra o núcleo celular por Friou em 1957 (19). O LES, até então considerado uma doença rara, transformou-se numa enfermidade comumente vista em enfermarias gerais de hospitais de ensino (2). A incidência de doenças do tecido conjuntivo, através do número de admissões de pacientes no Hospital *Medical Center*, em Los Angeles, evidenciou o crescente aumento do número de casos de LES por ano desde 1928: 1928 nenhum caso; 1938, 4 casos; 1948, 9 casos; 1958, 36 casos; 1968, 97 casos; 1978, 149 casos; 1982, 211 casos (20).

Não existem números precisos sobre a prevalência ou incidência do LES no Brasil e os dados que dispomos são da literatura estrangeira. A prevalência nos

Estados Unidos varia de 14,6 a 122 casos por 100.000 habitantes (21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28). Outros estudos para estimar a prevalência foram conduzidos na Suécia (29, 30), Finlândia (31), Islândia (32, 33), Nova Zelândia (34, 35), Malásia (36), Inglaterra (37, 38, 39, 40), China (41), Japão (42), Curaçao (43) e Irlanda do Norte (44). Destes estudos feitos em países de populações predominantemente brancas, a prevalência variou de 12,5 a 39 casos por 100.000 habitantes. Esta variação pode ser devida a diferentes metodologias empregadas nos estudos.

A incidência do LES nos Estados Unidos foi avaliada em vários estudos, variando de 1,8 a 7,6 casos por 100.000 habitantes/ano (21, 23, 24, 25, 26). Outros estudos internacionais da Islândia (33), Suécia (30), Reino Unido (38, 39, 45), Japão (42) e Curaçao (43) mostraram taxas de incidência semelhantes. Em estudos de coorte realizados nos Estados Unidos registrou-se um aumento na incidência do LES entre os anos de 1950 e 1992, elevando de 1,5 para 5,56 por 100.000 habitantes/ano (26). As possíveis explicações para o aumento na incidência são o diagnóstico de formas mais brandas da doença, aumento da utilização de terapias hormonais e a maior exposição a raios ultravioleta relacionado à diminuição da camada de ozônio.

O LES já foi considerado uma doença rara e fulminante que ocorria em mulheres jovens com o clássico eritema malar, levando ao óbito em alguns meses. O LES atualmente é conceituado como uma doença crônica de natureza pleomórfica. Não existe mais um padrão clássico e o diagnóstico deve ser baseado nos aspectos clínicos, com auxílio dos exames complementares laboratoriais, histopatológicos, de imagem e outros (46).

Os pacientes com LES podem apresentar uma grande diversidade de manifestações clínicas, desde sintomas constitucionais como febre, perda de peso, fraqueza, cansaço até envolvimento de vários órgãos e sistemas (47, 48).

Os estudos com biópsias e autópsia de pacientes com LES tem mostrado que o envolvimento renal é uma séria complicação da doença (49), sendo o rim um dos órgãos mais comumente afetados pelo LES (4). Com o uso da microscopia óptica, microscopia eletrônica e imunofluorescência, pequenas alterações podem ser encontradas na biópsia renal de quase todos os pacientes com LES (50, 51). Aproximadamente 75% das biópsias renais apresentadas em vários estudos foram classificadas como glomerulonefrites proliferativa focal, proliferativa difusa ou membranosa (52).

Houve um grande avanço no entendimento da patogênese de nefrite lúpica nas últimas décadas. A utilização destes conhecimentos otimizaram a interpretação das biópsias renais, proporcionando uma melhor correlação com as manifestações clínicas e a mais adequada abordagem terapêutica. A Organização Mundial da Saúde desenvolveu uma classificação para a nefrite lúpica (apêndice 2), facilitando a interpretação e aplicação clínica dos achados da biópsia renal (53).

A localização de imunocomplexos no rim parece ser o evento desencadeante para o surgimento da nefrite lúpica. São característicos no LES a presença de auto-anticorpos que reagem com DNA e outros componentes celulares, embora nem todos sejam nefritogênicos (4).

A reatividade cruzada dos auto-anticorpos anti-DNA com antígenos da superfície celular do glomérulo, bem como com componentes normais da membrana basal e matriz mesangial, provavelmente promove a formação de imunocomplexos e influencia a localização destes depósitos no glomérulo (54). Assim, fatores que levam ao depósito de muitos imunocomplexos pro-inflamatórios na região subendotelial da parede capilar do glomérulo, adjacente à circulação, são provavelmente indutores (através da liberação de componentes do complemento, citocinas e outros fatores) da proliferação celular, resposta inflamatória, necrose e,

eventualmente, fibrose (55). Além disso, um subtipo de auto-anticorpos pode penetrar as células glomerulares, ligar-se ao núcleo e contribuir para a proliferação glomerular e proteinúria (56). O dano à parede capilar do glomérulo parece ser induzido pela ativação do complemento e formação de complexo de ataque à membrana, C5b-9, que tem sido associado com este tipo de lesão mediada por imunocomplexos (57).

No LES o dano tecidual é mediado por auto-anticorpos, imunocomplexos, células T, citocinas, quimiocinas e outras moléculas pró-inflamatórias como radicais de oxigênio ativados e complemento. Indivíduos que desenvolvem a doença têm duas características principais: 1) podem produzir subtipos de auto-anticorpos patogênicos com formação de imunocomplexos e ativação de células T; e 2) alteração na capacidade de regular e destruir estes auto-anticorpos, imunocomplexos e células T ativadas adequadamente (58).

Existem inúmeras teorias para explicar o desencadeamento das alterações auto-imunes no LES. O mais provável é que múltiplos genes de susceptibilidade interajam com fatores ambientais para promover e perpetuar a ativação dos linfócitos T e B, o que leva a produção de auto-anticorpos e imunocomplexos patogênicos. A infiltração direta nos tecidos por células T, macrófagos e monócitos também tem um importante papel na doença. Pacientes com a doença são mais suscetíveis aos danos por auto-anticorpos e imunocomplexos. Isso pode ser resultado da capacidade de produção de subclasses de anticorpos patogênicos e ou da incapacidade de regulação da hiperatividade das células B e T *helper* e seus produtos (59).

As características estruturais e propriedades fisiológicas de muitos auto-anticorpos e imunocomplexos patogênicos já são conhecidas, mas se as diferenças entre pacientes com LES e indivíduos saudáveis é quantitativa ou qualitativa ainda não

está bem definido. Virtualmente toda rede regulatória que influencia a produção de anticorpos ou imunocomplexos está alterada em pacientes com LES, a semelhança do que ocorre em experimentos com modelo animal. Assim, a patogênese da doença pode depender de anormalidades na imunorregulação, associados a fatores genéticos e ambientais (58).

A compreensão da natureza e do significado da base genética da susceptibilidade ao LES permanece um dos maiores desafios ao conhecimento médico. Contudo, a completa expressão clínica do LES parece ser um evento final numa série de anormalidades que levam a doença. Os genes responsáveis pelo LES atuam definindo um estado de susceptibilidade genética caracterizada por penetrância incompleta, com concordância em gêmeos idênticos de 24-69% (60). O desenvolvimento da doença pode levar anos, como demonstrado por estudos familiares e de gêmeos, nos quais o longo acompanhamento resultou numa grande concordância para a expressão da doença. Também foram propostos quatro estágios no desenvolvimento da doença, começando com uma fase de predisposição e terminando com uma fase de dano tecidual (61).

O surgimento do LES está sob marcante controle genético, com maior ou menor participação de efeitos ambientais. É bastante provável que os fatores ambientais interagem com os genes de suscetibilidade modulando seus efeitos (62). Os efeitos ambientais estão mais provavelmente associados com a exposição a organismos ou moléculas que afetam ou modulam a formação do repertório de células T e B. Certas infecções podem fortemente modular o repertório de células T e expansão clonal de células B e aumentar a produção de imunoglobulinas; estimulados pela presença de um superantígeno ou através de efeito direto sobre as células linfóides. A ativação da célula B pode alterar a apresentação de auto-antígenos em decorrência de anormalidades no nível basal de processamento. A

fase de ativação policlonal do linfócito B pode resultar numa alteração celular promovendo a expressão de um receptor para uma estrutura própria, provocando uma ativação clonal de células T que resultaria em quebra de tolerância imunológica.

A exacerbação ou indução à atividade do LES pela exposição solar (raios UVB principalmente) está relacionada com a injúria tecidual determinada pela radiação no local. A luz ultravioleta leva a um apoptose dos queratinócitos, promovendo a expressão na superfície celular de material nucleossomal. Esta expressão dos antígenos na superfície celular de indivíduos portadores de anticorpos anti-DNA e/ou anti-Ro (SSA), associados a células T que reconheçam estes peptídeos de superfície, desencadearia uma reação inflamatória mediada por auto-anticorpos, resultando na dermatite lúpica (63).

A ingestão de medicamentos como procainamida, fenotiazida, isoniazida e hidralazina, dentre outros, podem induzir o surgimento de uma síndrome lúpus droga relacionada em uma pequena proporção das pessoas expostas. Entretanto essa síndrome é geralmente diferente do lúpus espontâneo e desaparece quando o medicamento indutor é retirado (64).

A estrutura dos auto-anticorpos é provavelmente importante na patogênese do LES. Há consideráveis evidências que os anticorpos contra o DNA que se ligam a estruturas da membrana basal do glomérulo são patogênicos (65, 66). Há evidências que o anti-DNA esteja associado com a nefrite lúpica. Muitos auto-anticorpos do lúpus podem ser marcadores da doença e não geradores de lesão tissular diretamente. Entretanto, os anticorpos anti-DNA, antifosfolípide, antineuronal, anti-Ro, antieritrócito, antilinfócito, e antiplaqueta parecem ter participação direta nas manifestações clínicas da doença. Outra observação da importância dos auto-anticorpos no LES é a recente descoberta que peptídeos

gerados pela degradação dos auto-anticorpos parecem ativar as células T, promovendo a produção adicional de auto-anticorpos (64).

O LES tem uma grande incidência em mulheres, particularmente na idade reprodutiva. Isto sugere que genes regulados por fatores dependentes do sexo, como hormônios gonadais, ou genes relacionados com o cromossomo duplo X estejam envolvidos. A fase da vida das mulheres em que a incidência do LES é aumentada coincide com a maior produção de hormônios femininos. O estrogênio e a testosterona têm mostrado efeito oposto na produção de auto-anticorpos, o que poderia contribuir para a diferença na incidência entre os sexos (67, 68). Além disso, os receptores de hormônios gonadais têm domínios DNA-ligante, que podem regular a transcrição de vários genes (69).

Outros hormônios como glicocorticóides e prolactina também tem efeitos imunomoduladores. Glicocorticóides, que também são produzidos no timo, podem ter um papel na seleção positiva ou negativa ou na tolerância de auto-antígenos (70, 71). Há, também, evidência de efeito parácrino pró-inflamatório do hormônio liberador de corticotrofina produzido no sítio da inflamação (72). Outros hormônios e neuro-hormônios ainda não estudados em doenças auto-imunes, como o LES, que poderiam estar envolvidos na modulação da doença, como as β -endorfinas ou catecolaminas (73, 74).

Várias citocinas, receptores de citocinas e genes que participam da ativação e maturação das células B e T podem ter um papel regulatório nesta doença. Um exemplo é o gene da interleucina-10. A interleucina-10 é produzida em altos níveis pelos linfócitos B e monócitos nos pacientes com LES; e regulam a produção de anti-DNA (75).

As quimiocinas estão sendo associadas com o estabelecimento do processo inflamatório nas doenças auto-imunes como a artrite reumatóide e o lúpus

eritematoso sistêmico (76). As quimiocinas são pequenas proteínas básicas que estão entre os maiores mediadores de toda migração leucocitária para o sítio da inflamação (77). Há pelo menos 46 quimiocinas distintas e 19 receptores de quimiocina. Elas podem ser benéficas ou danosas, tanto por estimular uma resposta imune apropriada contra microorganismos invasores quanto por mediar a destruição patológica de tecidos em muitos tipos de doenças humanas. As quimiocinas também estão associadas com dano tecidual em doenças como aterosclerose, rejeição de transplantes e câncer (78).

As quimiocinas são citocinas pró-inflamatórias que funcionam na ativação e atração química dos leucócitos. Há duas famílias maiores de quimiocinas, denominadas CXC e CC (79). As quimiocinas CXC agem sobre os neutrófilos e células não hematopoiéticas envolvidas na cicatrização, enquanto as quimiocinas CC tem um amplo espectro de ação, agindo sobre os monócitos, linfócitos T e B, *natural killer* e células dendríticas (80). Monócitos e macrófagos teciduais são fontes ricas de quimiocinas CC. A MCP-1 e MCP-2 (*monocyte chemoattractant protein-1*) são os principais produtos dos monócitos estimulados. Os linfócitos são fontes de algumas quimiocinas, particularmente RANTES (*regulated upon activation of normal T cell expressed and secreted*), MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein-1*) e MIP-1 β . Células endoteliais, fibroblatos, células epiteliais e outras células renais também produzem quimiocinas CC depois de um estímulo apropriado (81, 82).

As funções das quimiocinas são mediadas através de receptores de quimiocinas transmembrana expressos na superfície de várias células (5). Sua expressão é mais comum entre certos tipos celulares, especificamente linfócitos Th1 e macrófagos, levando a uma resposta imune do tipo Th1 (8). O receptor de quimiocina beta CCR5 pertence a super família da proteína ligante GTP

heterotrimérica (proteína G) (6). É o maior receptor celular das quimiocinas RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β , sendo também um eficiente co-receptor para o vírus do HIV-1 com tropismo por macrófagos (7).

A descoberta de que certos receptores de quimiocinas, principalmente o CCR5, serviriam como portas para a entrada do vírus do HIV-1 nas células, foi um importante avanço no entendimento da patogênese da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (83, 84, 85, 86). Numa rápida sucessão de estudos epidemiológicos, identificou-se a existência de um alelo mutante para o gene CCR5, que carrega uma deleção de 32 pares de bases (delta32). A frequência genotípica desta deleção foi 1% de homozigotos e 20% de heterozigotos na população branca norte-americana. Negros africanos e asiáticos não apresentaram o gene com deleção delta32 (CCR5 Δ 32) (10,87). O mais importante foi que indivíduos homozigotos para o alelo com a deleção eram resistentes contra a infecção pelo vírus do HIV-1 com tropismo por macrófagos (9, 10, 87, 88). Indivíduos heterozigotos parecem não estarem protegidos contra a infecção pelo HIV-1; entretanto, apresentam uma menor carga viral, uma progressão de doença mais lenta (89). Verificou-se, também, uma menor frequência de heterozigotos nos soropositivos (87).

A variante polimórfica CCR5 Δ 32 apresenta uma deleção de 32 pb que provoca a produção de uma proteína truncada e completa perda do receptor na superfície celular, nos indivíduos homozigotos. O alelo CCR5 Δ 32 tem sido estudado e sua frequência varia de zero em populações não caucasóides até aproximadamente 14% em certas populações européias. Há evidências que a perda da expressão do CCR5 poderia afetar certas respostas inflamatórias, resultando em proteção contra o surgimento e severidade de certas condições inflamatórias como a artrite reumatóide (11,12), outras doenças auto-imunes e

inflamatórias crônicas como glomerulonefrites, nefrite lúpica, asma e esclerose múltipla (13, 14, 90, 91, 92). Aproximadamente 20 a 30% das células T periféricas e 10% dos monócitos são CCR5 positivos (14).

O receptor de quimiocina CCR5 tem papel importante na patogênese da inflamação da artrite reumatóide (76). Está associado com o surgimento de artrite em ratos com artrite induzida (93). Indivíduos homozigotos para a deleção CCR5 Δ 32 estão protegidos contra o desenvolvimento de artrite reumatóide segundo dois estudos (12, 94). Outro estudo mostrou que indivíduos portadores de artrite reumatóide e com presença do alelo para a deleção CCR5 Δ 32 teriam uma doença menos destrutiva em comparação com doentes que não tinham o alelo (11). Também foi demonstrado que na inflamação da sinóvia (sinovite) de portadores de artrite reumatóide, a infiltração leucocitária por mononucleares era predominantemente de células que expressavam o receptor CCR5 (95).

A presença de células inflamatórias, principalmente fagócitos mononucleares, no rim é a característica básica na nefrite e conseqüente dano renal. Tem se tornado claro que esses leucócitos são atraídos ao sítio da lesão por quimiocinas; e há evidências, que as quimiocinas também iniciariam a inflamação renal (82, 96). O receptor de quimiocina CCR5 está envolvido na patogênese das glomerulonefrites, tanto os decorrentes de doenças auto-imunes como as de outras causas (14). Em modelo animal de nefrite lúpica, a quimiocina e o receptor de quimiocina CCR5 também estão envolvidos na infiltração inflamatória do glomérulo e no dano renal (13). Já foi comprovado um aumento de células com receptor CCR5 na glomerulonefrite humana; e o uso do glicocorticoide, em doses imunossupressoras, diminuiu a quantidade destas células com redução significativa da resposta inflamatória (92, 97).

A presença da deleção CCR5 Δ 32 foi estudada em pacientes que receberam transplante renal. Os que eram homozigotos para a deleção tiveram uma maior sobrevida no transplante, com menos lesão inflamatória no órgão transplantado. Isso sugere que o receptor CCR5 tem um papel na fisiopatologia da rejeição do transplante (98, 99).

CONCLUSÃO

Os intensos esforços para elucidar a patogênese do lúpus eritematoso sistêmico evidenciam a participação de múltiplos fatores no desencadeamento da doença (100). Embora a doença seja homogênea e tenha um curso e incidência previsível em linhagens de camundongos com lúpus induzido, a resposta auto-imune em humanos com LES é extremamente variável (101). Além do mais, muitos fatores genéticos e ambientais parecem contribuir para sua patogênese, tornando pouco provável uma explicação única para o surgimento desta doença (102). O mais provável é que diferentes fatores etiológicos e patogênicos atuem de forma variada em cada paciente, acarretando uma marcada heterogeneidade na apresentação clínica e anormalidades laboratoriais encontradas nos pacientes com LES (103).

O desafio aos pesquisadores em elucidar as complexas variáveis genéticas e ambientais que concorrem para o desencadeamento do lúpus eritematoso sistêmico e identificação de fatores individualizados para cada expressão da doença, estimulam a pesquisa de novos elementos implicados na patogênese, assim como a modificação na estrutura do receptor CCR5, motivo desta pesquisa.

OBJETIVOS

Analisar possíveis associações, de diferentes alelos polimórficos, dos genes relacionados ao receptor de quimiocina CCR5 com o lúpus eritematoso sistêmico com e sem nefrite lúpica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grossman JM, Kalunian KC. Definition, classification, activity, and damage indices. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. Dubois' Lupus Erythematosus. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 19-32.
2. Brenol JCT. Frequência dos auto-anticorpos antinucleares e suas associações com manifestações clínico-laboratoriais, numa população de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1994. Tese de Doutorado em Clínica Médica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
3. Dayal AK, Kammer GM. The T cell enigma in lúpus. *Arthritis Rheum* 1996; 39:23-33.
4. Boumpas DT, Fessler BJ, Austin III HA, Balow JE, Klippel JH, Lockshin MD. Systemic lupus erythematosus: Emerging concepts. Part 1: Renal, neuropsychiatric, cardiovascular, pulmonary, and hematologic disease. *Ann Intern Med* 1995; 122:940-950.
5. Ward SG, Bacon K, Westwick J. Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity* 1998; 9:1-9.
6. Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1 beta and MIP1 alpha. *J Biol Chem* 1996; 271: 17161-17166.
7. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996; 381: 667-73.
8. Loetscher P, Uguccioni M, Bordolini L, Baggiolini M, Moser B. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391:344-5.

9. Zimmerman PA, Buckler-White A, Alkhatib G, Spalding T, Kubofcik J, Combadiere C, et al. Inherited resistance to HIV-1 infection conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5 – studies in populations with contracting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol Med* 1997; 3:23-26.
10. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86:367-77.
11. Zapico I, Coto E, Rodriguez A, Alvarez C, Torre JC, Alvarez V. CCR5 (chemokine receptor-5) DNA-polymorphism influences the severity of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2000; 1(4): 288-9.
12. Gómez-Reino JJ, Pablos JL, Carreira PE, Santiago B, Serrano L, Vicario JL, et al. Association of rheumatoid arthritis with a functional chemokine receptor, CCR5. *Arthritis Rheum* 1999; 42:989-992.
13. Perez de Lema G, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, et al. Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12 (7): 1369-82.
14. Segerer S, Mack M, Regele H, Kerjaschki D, Schlöndorff D. Expression of the C-C chemokine receptor 5 in human kidney diseases. *Kidney Int* 1999; 56:52-64.
15. Cohen AS, Reynolds WE, Franklin EC, et al. Preliminary criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Bull Rheum Dis* 1971;21:643-48.
16. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-7.

17. Hochberg Mc. Updating the American College of Rheumatology Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus (letter). *Arthritis Rheum* 1997; 40:1725.
18. Hargraves MM, Richmond H, Morton R: Presentation of two bone marrow elements: the tart cell and the LE cell. *Mayo Clin Proc* 1948; 23: 25-28.
19. Friou GJ: Clinical application of lupus serum: nucleoprotein reaction using the fluorescent antibody technique. *J Clin Invest* 1957; 36:890.
20. Dubois EL, Wallace DJ. Clinical and laboratory manifestations of systemic lupus erythematosus. In: Dubois EL, Wallace DJ, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1987: 317-449.
21. Michet CJ Jr, McKenna CH, Elveback LR. Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue disease in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. *Mayo Clin Proc* 1985;60:105-113.
22. Hochberg Mc, Perlmutter DL, Medsger TA. Prevalence of self-reported physician-diagnosed systemic lupus erythematosus in the USA. *Lupus* 1995;4:454-456.
23. Fessel WJ. Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women. *Arch Intern Med* 1974; 134:1027-1035.
24. Kurland LT, Hauser WA, Fergunson RH. Epidemiologic features of diffuse connective tissue disorders in Rochester, Minn., 1951 through 1967, with especial reference to systemic lupus erythematosus. *Mayo Clin Proc* 1969;44:649-663
25. Siegel M, Lee SL. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 1973;3:1-54.

26. Uramoto KM, Michet CJ Jr, Thumboo J. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis Rheum* 1999;42:46-50.
27. Maskarinec G, Katz AR. Prevalence of systemic lupus erythematosus in Hawaii: is there a difference between ethnic groups? *Hawaii Med J* 1995; 54:406-409.
28. Lahita RG. Special report: adjusted lupus prevalence. Results of a marketing study by the Lupus Foundation of America. *Lupus* 1995; 54:406-409.
29. Jonsson H, Nived O, Sturfelt G. Outcome in systemic lupus erythematosus: a prospective study of patients from a defined population. *Medicine (Baltimore)* 1989;68:141-150.
30. Nived O, Sturfelt G, Wollhein F. Systemic lupus erythematosus in an adult population in southern Sweden: incidence, prevalence and validity of ARA revised classification criteria. *Br J Rheumatol* 1985;24:147-154.
31. Helve T. Prevalence and mortality rates of systemic lupus erythematosus and causes of death in SLE patients in Finland. *Scand J Rheumatol* 1985;1443-46.
32. Teitsson I, Thorsteinsson J. Systemic lupus erythematosus in Iceland. *Iceland Med J* 1978;64(suppl):116.
33. Gudmundsson S, Steinsson K. Systemic lupus erythematosus in Iceland 1975 through 1984. A nationwide epidemiological study in a unselected population. *J Rheumatol* 1990;17:1162-1167.
34. Meddings J, Grennan DM. The prevalence of systemic lupus erythematosus (SLE) in Dunedin. *NZ Med J* 1980;91:205-206.
35. Hart HH, Grigor RR, Caughey DE. Ethnic difference in the prevalence of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1983;42:529-532.
36. Frank AO. Apparent predisposition to systemic lupus erythematosus in Chinese patients in West Malaysia. *Ann Rheum Dis* 1980;39:266-269.

37. Samanta A, Roy S, Feehally J. the prevalence of diagnosed systemic lupus erythematosus in whites and Indian Asian immigrants in Leicesters city, UK. *Br J Rheumatol* 1992;31:679-682.
38. Hopkinson ND, Doherty M, Powell RJ. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Nottingham, UK, 1989-1990. *Br J Rheumatol* 1993;32:110-115.
39. Johnson AE, Gordon C, Palmer RG. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum* 1995;38:551-558.
40. Hochberg Mc. Prevalence of systemic lupus erythematosus in England and Wales, 1981-2. *Ann Rheum Dis* 1987;46:664-66.
41. Nai-Zheng C. Rheumatic diseases in China. *J Rheumatol* 1983;10 (suppl 10):41-44.
42. Iseki K, Miyasato F, Oura T. An epidemiologic analysis of end-stage lupus nephritis. *Am J Kidney dis* 1994;23:547-554.
43. Nossent JC. Systemic lupus erythematosus on the Caribbean island of Curacao: an epidemiological investigation. *Ann Rheum Dis* 1992;51:1197-1201.
44. Gourley IS, Patterson CC, Bell AL. The prevalence of systemic lupus erythematosus in Northern Ireland. *Lupus* 1997;6:399-403.
45. McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA Jr. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum* 1995;38:1260-1270.
46. Wallace DJ. The clinical presentation of systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 621-628.

47. Pistiner M, Wallace DJ, Nessim S, et al. Lupus erythematosus in the 1980s: a survey of 570 patients. *Semin Arthritis Rheum* 1991;21:55-64.
48. Jacobsen S, Petersen J, Ullman S, et al. A multicentre study of 513 Danish patients with systemic lupus erythematosus: I. Disease manifestations and analyses of clinical subsets. *Clin Rheumatol* 1998;17:468-477.
49. Kashgarian M. Lupus nephritis: Pathology, pathogenesis, clinical correlations, and prognosis. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 1061-1076.
50. Pollak V, Pirani C. Renal histologic findings in systemic lupus erythematosus. *Mayo Clin Proc* 1969;44:630-644.
51. Woolf A, Croker B, Osafsky S, et al. Nephritis in children and young adults with systemic lupus erythematosus and normal urinary sediment. *Pediatrics* 1979;64:678-685.
52. Golbus J, McCune WJ. Lupus nephritis. Classification, prognosis, immunopathogenesis, and treatment. *Rheum Dis Clin North Am* 1994;20:213-42.
53. McCluskey R. Lupus nephritis. In: Summers SC, ed. *Kidney pathology*. New York: Appleton-Century Crofts, 1975:456-459.
54. Foster MH, Cizman B, Madaio Mp. Nephritogenic autoantibodies in systemic lupus erythematosus: immunochemical properties, mechanism of immune depositions, and genetic origins. *Lab Invest* 1993;69:494-507.
55. Couser WG. Pathogenesis of glomerulonephritis. *Kidney Int Suppl* 1993;42:S19-26.
56. Vlabakos D, Foster MH, Ucci AA, Barrett KJ, Datta SK, Madaio MP. Murine monoclonal anti-DNA antibodies penetrate cells, bind to nuclei, and induce

- glomerular proliferation and proteinuria in vivo. *J Am Soc Nephrol* 1992;2:1345-54.
57. Kerjaschki D. The pathogenesis of membranous glomerulonephritis: from morphology to molecules. *Virchows Archiv B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1990; 58:253-71.
58. Hahn BH. An overview of the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 87-96.
59. Mohan C, Morel L, Yang P, et al. Genetic dissection of lupus pathogenesis: a recipe for nephrophilic autoantibodies. *J Clin Invest* 1999; 103:1683-1695.
60. Deapen DM, Escalante A, Weinrib AL, Horwitz DA, Mack TM. A revised estimate of twinconcordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1992;35:311-318.
61. Winchester RJ. Systemic lupus erythematosus: pathogenesis. In: Koopman WJ, editor. *Arthritis and Allied Conditions, a Textbook of Rheumatology*. Baltimore Williams & Wilkins, 1997:1361-1391.
62. Gulko PS, Winchester RJ. Genetics of Systemic Lupus Erythematosus. In: Kammer GM, Tsokos GC, editors. *Lupus: Molecular and Cellular Pathogenesis*. Totowa, NJ: Humana Press, Inc.; 1999:101-123.
63. Sontheimer RD. Photoimmunology of lupus erythematosus and dermatomyositis: a speculative review. *Photochem Photobiol* 1996; 63:583-594.
64. Hahn BH. An overview of the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. *Dubois' Lupus Erythematosus*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002:87-96.
65. Madaio MP. The role of autoantibodies in the pathogenesis of lupus nephritis. *Semin Nephrol* 1999;19:48-56.

66. Hahn BH. Antibodies to DNA. *N Eng J Med* 1998;338:1359-68.
67. Cutolo M, Sulli A, Serio B, Accardo S, Masi AT. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13:217-226.
68. Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Testosterone suppresses anti-DNA antibody production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1703-1711.
69. Ribeiro RC, Kushner PJ, Baxter JD. The nuclear hormone receptor gene superfamily. *Annu Rev Med* 1995;46:443-453.
70. Vacchio MS, Ashwell JD. Thymus-derived glucocorticoids regulate antigen-specific positive selection. *J Exp Med* 1997;185:2033-2038.
71. Vacchio MS, Papadopoulos V, Ashwell JD. Steroid production in the thymus: implications for thymocyte selection. *J Exp Med* 1995;179:1835-1846.
72. Karalis K, Sano H, Redwine J, Listwak S, Wilder RL, Chrousos GP. Autocrine and paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science* 1991; 254:421-423.
73. Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RL, Chrousos GP. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human Interleukin-12 and Interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians* 1996;108:374-381.
74. Panerai AE, Cacerdote P. Beta-endorphin in the immune system: a role at last? *Immunol Today* 1997;18:17-20.
75. Llorente L, Zou W, Levy Y, Richaud-Patin Y, Wijdeness J, Alcocer-Varela J, et al. Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1995;181:839-844.

76. Garred P, Madsen HO, Petersen J, Marquart H, Hansen TM, Freiesleben Sorensen S, et al. CC chemokine receptor 5 polymorphism in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1998;25:1462-65.
77. Keane MP, Strieter RM. Chemokine signaling in inflammation. *Crit Care Med* 2000; 28:3330-39.
78. Christopherson K 2nd, Hromas R. Chemokine regulation of normal and pathologic immune responses. *Stem Cells* 2001;19:388-96.
79. Luster AD. Chemokines-Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338:436-45.
80. Lloyd C, Gutierrez-Ramos JC. The role of chemokines in tissue inflammation in renal diseases. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998; 7:281-87.
81. Premark BA, Schall TJ. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat Med* 1996; 2:1174-78.
82. Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, Wells TN, Salant DJ, et al. RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med* 1997; 185:1371-80.
83. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, et al. CCR5: a RANTES, MIP-1 alpha, MIP-1 beta receptor as a fusion cofactor fo macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996;272:1955-58.
84. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, et al. A dual primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CCR5, CCR3, and CCR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996;85:1149-58.
85. Choe H, Farzan M, Sun Y, et al. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996;85:1135-48.

86. Deng H, Liu R, Ellmeier W, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996;381:661-66.
87. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996;382:722-25.
88. Dean M, Carrington M, Winkler C, et al. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CCR5 structural gene. *Science* 1996;273:1856-62.
89. Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1996;2:1240-43.
90. Sellebjerg F, Madsen HO, Jensen CV, Jensen J, Garred P. CCR5 delta32, matrix metalloproteinase-9 and disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000; 102:98-106.
91. Hall IP, Wheatley A, Christie G, McDougall C, Hubbard R, Helms PJ. Association of CCR5 delta32 with reduced risk of asthma. *Lancet* 1999; 354:1264-65.
92. Furuichi K, Wada T, Sakai N, Iwata Y, Yoshimoto K, Shimizu M, et al. Distinct expression of CCR1 and CCR5 in glomerular and interstitial lesions of human glomerular diseases. *Am J Nephrol* 2000; 20:291-9.
93. Plater-Zyberk C, Hoogewerf AJ, Proudfoot AEI, Power CA, Wells TNC. Effect of a chemokine receptor antagonist on collagen induced arthritis in DBA/1 mice. *Immunol Letters* 1997;57:117-120.
94. Cooke SP, Forrest G, Venables PJ, Hajeer A. The delta32 deletion of CCR5 receptor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42:2732-3.

95. Mack M, Bruhl H, Gruber R, Jaeger C, Cihak J, Eiter V, et al. Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusions with different forms of arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:981-88.
96. Panzer U, Stahl RA. Chemokines and renal inflammation. *Nephrologie* 1999;20:335-41.
97. Wada T, Furuichi K, Segawa-Takaeda C, Shimizu M, Sakai N, Takeda S, et al. MIP-1 and MCP-1 contribute to crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney International* 1999;56:995-1003.
98. Fischereder M, Luckow B, Hoher B, Wüthrich RP, Rothenpieler U, Schneeberger H, et al. CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival. *Lancet* 2001; 357:1758-61.
99. Segerer S, Cui Y, Eitner F. Statement of chemokines and chemokines receptors during human renal transplant rejection. *Am J Kidney Dis*, 2001;37:518-31.
100. Boumpas DT, Fessler BJ, Austin III HA, Balow JE, Klippel JH, Lockshin MD. Systemic lupus erythematosus: Emerging concepts. Part 2: Dermatologic and joint disease, the antiphospholipid antibody syndrome, pregnancy and hormonal therapy, morbidity and mortality, and pathogenesis. *Ann Intern Med* 1995; 123:42-53.
101. Schwartz RS. Autoimmunity and autoimmune diseases. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. New York: Raven, 1993:1033-97.
102. Theofilopoulos NA. Mechanisms and genetics of autoimmunity. *Immunol Today* 1995;16:90-8.
103. Steinberg AD, Gourley MF, Klinman DM, Tsokos GC, Scott DE, Krieg AM. NIH conference. Systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 1991;115:548-59.

VERSÃO EM INGLÊS DO ARTIGO

The Chemokine receptor CCR5 Δ 32 allele and susceptibility to Systemic

Lupus Erythematosus

João Adalberto Marasca, João Carlos Tavares Brenol, Ricardo Machado Xavier, José Artur Bogo Chies.

Objective: To investigate whether systemic lupus erythematosus (SLE) or lupus nephritis are associated with a DNA polymorphic variant of the proinflammatory chemokine receptor CCR5 gene containing a 35bp deletion (the CCR5 Δ 32 allele).

Methods: The CCR5 genes of 136 SLE patients (101 Caucasians and 35 African-Brazilians) and of 160 healthy controls were genotyped at the CCR5 gene using specific primers flanking the region of deletion. Lupus nephritis was present in 69 patients (54 Caucasians and 15 African-Brazilians).

Results: The frequencies of the CCR5 Δ 32 allele were similar in SLE patients and the control group (0.031 and 0.033 respectively, $p=0.912$). Moreover, there were no differences among in the allelic frequencies when comparing groups classified according the presence or absence of nephritis or WHO proliferative subtypes of nephritis (class III and IV).

Conclusions: Despite the described role of the chemokine receptor CCR5 in kidney inflammatory lesions, the CCR5 Δ 32 allelic variant does not appear to be significantly involved in genetic susceptibility to SLE or lupus nephritis.

Key words: chemokines, systemic lupus erythematosus, CCR5 polymorphism, lupus nephritis

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Departamento de Genética.

Supported by CAPES, from Ministério da Educação e Cultura

JA Marasca, MD; RM Xavier, PhD; JCT Brenol, PhD: Hospital de Clínica de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; JAB Chies, PhD: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética, Porto Alegre, Brasil.

Address reprint request and correspondence about article to Ricardo M Xavier, PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, Brasil. E-mail: rxavier@hcpa.ufrgs.br

Chemokines are chemoattractant cytokines released by a wide variety of cells. Their biologic functions include chemotaxis of leukocytes, adhesion of cells and penetration across of endothelial cells. Recruit leukocytes in inflammatory processes such as rheumatoid synovitis and glomerular diseases. Their functions are mediated through transmembrane chemokine receptors (1). The chemokine receptor CCR5 belongs to the heterotrimeric GTP-binding protein (G protein)-coupled receptor super family (2). It is the major cellular receptor for RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β , as well as an efficient co-receptor for macrophage-tropic isolates of HIV-1 (3). This molecule is more common among certain cell types, specifically Th1 lymphocytes and dendritic cells, driving an immune response directed to a Th1 subtype (4).

The polymorphic allele CCR5 Δ 32 presents a 32bp deletion that leads to truncation and complete loss of the receptor on the cell surface of homozygous individuals. The CCR5 Δ 32 allele has been studied and its frequency vary from zero in non-Caucasoid populations to approximately 14% in certain European populations. The CCR5 Δ 32 homozygous individuals are resistant against macrophage-tropic HIV-1 virus infection (5, 6). There is also evidence that this lack of expression could impair certain inflammatory responses and result in protection against onset and severity of inflammatory conditions such as rheumatoid arthritis (7,8).

CCR5 has been found to be involved in the pathogenesis of an animal model of lupus nephritis (9), and CCR5-positive activated macrophage and T cells have been shown to accumulate in the glomerular and interstitial lesions of lupus nephritis, indicating an important role of this chemokine receptor in this disease (10). Because of the potential protection against inflammatory conditions in the presence

of the CCR5 Δ 32 allele, we investigated whether it is associated with a decreased genetic susceptibility to SLE or lupus nephritis.

Patients. We studied 136 patients (74.3% Caucasians and 25.7% African-Brazilians) with SLE (American College of Rheumatology criteria) (11) who were followed at the Rheumatology Division of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre- Brazil); 69 patients had lupus nephritis (30 with biopsy proven proliferative type, WHO class III and IV). Peripheral blood samples were collected from these patients, as well as from 160 healthy volunteer blood donors (63.7% Caucasians and 36.3% African-Brazilians) who constituted the control group. This study was approved by the institutional ethics committee and all subjects have signed an informed consent.

Methods. After genomic DNA extraction from the peripheral blood, polymerase chain reaction (PCR) amplification of a region of the CCR5 gene containing the delta32 deletion was performed, utilizing the 5'GGTCTTCATTACACCTGC 3' as the sense primer and 5'AGGATTCCCGAGTAGCAGATG 3' as the antisense primer. The PCR was performed under the following conditions: 94°C for 3 minutes, 94°C for 30 seconds, 60°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute for 35 cycles, and then 72°C for 5 minutes. The PCR products were electrophoresed on ethidium bromide-stained 3% agarose gels and visualized under ultraviolet light. The PCR amplification results in a 137bp fragment when the normal CCR5 allele is present, whereas the deleted variant generates a 105bp fragment.

Statistical analysis. The results were calculated using 2 x 2 contingency tables, and comparisons were done by non-parametric tests (chi-square test with Yates' correction). For statistical significance we considered a $p < 0,05$.

RESULTS

The SLE patients were classified according to ethnic background in Caucasians or African-Brazilians for separate analysis, but no difference in the CCR5 Δ 32 allelic frequency was observed between these two groups, probably due to high miscegenation rates in the Brazilian population (data not shown). The CCR5 alleles were found to be distributed according to the Hardy-Weinberg equilibrium.

There were no differences in the allelic frequency of CCR5 Δ 32 variant between SLE patients and the control group ($\chi^2 = 0.01$ with Yates' correction, $p = 0.912$) or between patients with lupus nephritis and controls ($\chi^2 = 0.00$, with Yates' correction, $p = 0.990$). The genotype and the allelic frequencies of the SLE patients (with and without lupus nephritis) and controls are summarized in Table 1. No individuals homozygous to the CCR5 Δ 32 deletion were observed in the control or SLE groups.

A comparison of the proliferative subgroups of lupus nephritis with both controls and SLE patients without nephritis was done. Each subgroup sample size was small, yet there were no significant differences among them concerning the CCR5 Δ 32 allelic variant frequency (data not shown).

DISCUSSION

SLE is a polygenic disease that has been demonstrated to be associated with class II HLA-DR2 and DR3. The participation of other genes outside the chromosome 6 in genetic susceptibility to SLE is probable (12).

Our results demonstrated that the CCR5 Δ 32 polymorphism does not appear to be involved in genetic susceptibility to SLE or lupus nephritis. Since no homozygous individual was observed in any group, we cannot rule out that CCR5 Δ 32 could protect against SLE or lupus nephritis. However, due to the

similarities in the allelic frequencies in the studied groups and the number of SLE patients included in our analysis, it is unlikely and any protective effect would be too small to be of epidemiological significance. Even after stratifying the patients by different WHO class of nephritis, we failed to show any difference between patients and controls.

The role of CCR5 in kidney inflammation has been reported in several studies, as can be exemplified by a correlation between nephritis and cellular infiltrates expressing CCR5 in biopsies (10, 13). The expression of CCR5 seems to be important on the initiation of lupus nephritis in animal models (9) and, in a study focused on CCR5 positive cells and renal diseases, the authors suggested an involvement of this molecule in the site of inflammation (13). Furthermore, a survey in recipients of renal transplant showed that graft survival was significantly longer in CCR5 Δ 32 homozygous patients, suggesting a role for CCR5 in the pathogenesis of transplant rejection (14).

There are also indications of a protective role of the CCR5 Δ 32 deletion in rheumatoid arthritis (15) and other autoimmune and chronic inflammatory diseases (16, 17). However, our data clearly indicate that even if the CCR5 molecule play a role in the inflammatory processes that occur in SLE and in lupus nephritis, the CCR5 Δ 32 allelic variant does not seem to be associated with prevention or protection to this condition. This observation suggests that different and complex physiopathogenic processes may be acting in these diseases. One possible explanation for this difference is that in rheumatoid synovium the infiltrating memory T cells have a functional Th1 phenotype, while in SLE, which is considered to be a Th2-mediated disease, the participation of the CCR5 could be less important. Further studies of Th1 or Th2-mediated diseases would help to clarify this matter.

Table 1. Genotype and allelic frequency of CCR5 and $\Delta 32$ CCR5 in patients with systemic erythematosus lupus (SLE), lupus nephritis and controls

	Controls		SLE		Lupus Nephritis	
	n	freq	n	freq	n	freq
Genotype						
CCR5/CCR5	150	0.937	127	0.934	64	0.928
CCR5/ $\Delta 32$ CCR5	10	0.063	9	0.066	5	0.072
Total	160	1.000	136	1.000	69	1.000
Allele						
CCR5	310	0.969	263	0.967	133	0.964
$\Delta 32$ CCR5	10	0.031	9	0.033	5	0.036
Total	320	1.000	272	1.000	138	1.000

REFERENCES

1. Ward SG, Bacon K, Westwick J. Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity* 1998; 9:1-9.
2. Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1 beta and MIP1 alpha. *J Biol Chem* 1996; 271: 17161-17166.
3. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996; 381: 667-73.
4. Loetscher P, Uguccioni M, Bordolini L, Baggiolini M, Moser B. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391:344-5.
5. Zimmerman PA, Buckler-White A, Alkhatib G, Spalding T, Kubofcik J, Combadiere C, et al. Inherited resistance to HIV-1 infection conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5 – studies in populations with contracting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol Med* 1997; 3:23-26.
6. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86:367-77.
7. Zapico I, Coto E, Rodriguez A, Alvarez C, Torre JC, Alvarez V. CCR5 (chemokine receptor-5) DNA-polymorphism influences the severity of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2000; 1(4): 288-9.
8. Gómez-Reino JJ, Pablos JL, Carreira PE, Santiago B, Serrano L, Vicario JL, et al. Association of rheumatoid arthritis with a functional chemokine receptor, CCR5. *Arthritis Rheum* 1999; 42:989-992.

9. Perez de Lema G, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, et al. Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12 (7): 1369-82.
10. Segerer S, Mack M, Regele H, Kerjaschki D, Schlöndorff D. Expression of the C-C chemokine receptor 5 in human kidney diseases. *Kidney Int* 1999; 56:52-64.
11. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-7.
12. Gulko PS, Winchester RJ. Genetics of Systemic Lupus Erythematosus. In: Kammer GM, Tsokos GC, editors. *Lupus: Molecular and Cellular Pathogenesis*. Totowa, NJ: Humana Press, Inc.; 1999:101-23.
13. Furuichi K, Wada T, Sakai N, Iwata Y, Yoshimoto K, Shimizu M, et al. Distinct expression of CCR1 and CCR5 in glomerular and interstitial lesions of human glomerular diseases. *Am J Nephrol* 2000; 20:291-9.
14. Fischereder M, Luckow B, Hoher B, Wüthrich RP, Rothenpieler U, Schneeberger H, et al. CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival. *Lancet* 2001; 357:1758-61.
15. Cooke SP, Forrest G, Venables PJ, Hajeer A. The delta32 deletion of CCR5 receptor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42:2732-3.
16. Hall IP, Wheatley A, Christie G, McDougall C, Hubbard R, Helms PJ. Association of CCR5 delta32 with reduced risk of asthma. *Lancet* 1999; 354:1264-65.

17. Sellebjerg F, Madsen HO, Jensen CV, Jensen J, Garred P. CCR5 delta32, matrix metalloproteinase-9 and disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000; 102:98-106.

ARTIGO EM PORTUGUÊS

O receptor de quimiocina alelo CCR5 Δ 32 e a suscetibilidade para o Lúpus

Eritematoso Sistêmico

João Adalberto Marasca, João Carlos Tavares Brenol, Ricardo Machado Xavier, José Artur Bogo Chies.

Objetivo: Investigar se o lúpus eritematoso sistêmico (LES) ou a nefrite lúpica estão associados com a variante polimórfica do receptor da quimiocina próinflamatória CCR5 que contém uma deleção de 32pb (o alelo CCR5 Δ 32).

Métodos: Para a genotipagem do CCR5, um segmento do gene CCR5 de 136 pacientes com LES (101 caucasóides e 35 afro-brasileiros) e de 160 controles sadios foi amplificado usando primers específicos que se ligam a regiões flanqueadoras da região de deleção. Nefrite lúpica foi encontrada em 69 pacientes (54 caucasianos e 15 afro-brasileiros).

Resultados: A frequência alélica da variante CCR5 Δ 32 foi semelhante nos pacientes com LES e no grupo controle (0.031 e 0.033 respectivamente, $p=0.912$). Também não houve diferença na frequência alélica entre grupos classificados de acordo com a presença ou ausência de nefrite lúpica ou entre as nefrites proliferativas pela classificação da OMS. Não foi encontrado homozigoto para o alelo CCR5 Δ 32 em qualquer grupo.

Conclusão. Apesar do papel descrito do receptor de quimiocina CCR5 Δ 32 nas lesões inflamatórias renais, a variante alélica do CCR5 Δ 32 não parece estar envolvida na suscetibilidade genética para o LES ou nefrite lúpica.

Palavras-chave: quimiocinas, lúpus eritematoso sistêmico, polimorfismo CCR5, nefrite lúpica.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Departamento de Genética.

Financiado pela CAPES, do Ministério da Educação e Cultura.

JA Marasca, MD; RM Xavier, PhD; JCT Brenol, PhD: Hospital de Clínica de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil; JAB Chies, PhD: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Genética, Porto Alegre, Brasil.

Endereço para cópias e correspondência sobre o artigo para: Ricardo M Xavier, PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, Brasil. E-mail: rxavier@hcpa.ufrgs.br

As quimiocinas recrutam leucócitos nos processos inflamatórios como na sinovite da doença reumatóide e doenças glomerulares. Suas funções são mediadas através de receptores de quimiocinas transmembrana (1). O receptor de quimiocina beta CCR5 pertence a super família da proteína ligante GTP heterotrimérica (proteína G) (2). É o maior receptor celular das quimiocinas RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β , sendo também um eficiente co-receptor para o vírus do HIV-1 com tropismo por macrófagos (3). Sua expressão é mais comum entre certos tipos celulares, especificamente linfócitos Th1 e macrófagos, levando a uma resposta imune do tipo Th1(4). A variante polimórfica CCR5 Δ 32 apresenta uma deleção de 32 pb que provoca a produção de uma proteína truncada e completa perda do receptor na superfície celular, nos indivíduos homozigotos. O alelo CCR5 Δ 32 tem sido estudado e sua frequência varia de zero em populações não Caucásoides até aproximadamente 14% em certas populações européias. Os indivíduos homozigotos para CCR5 Δ 32 são relativamente resistentes à infecção pelo vírus HIV-1 com tropismo por macrófagos (5, 6). Também há evidências que a perda da expressão do CCR5 poderia afetar certas respostas inflamatórias, resultando em proteção contra o surgimento e severidade de certas condições inflamatórias como a artrite reumatóide (7,8).

O CCR5 foi associado à patogênese da nefrite lúpica em um modelo animal (9). Mostrou-se que macrófagos CCR5 ativados e células T se acumularam nas lesões intersticiais e glomerulares da nefrite lúpica, indicando um importante papel deste receptor de quimiocina nesta doença (10). Devido à potencial proteção contra condições inflamatórias relacionadas à presença do alelo CCR5 Δ 32, nós investigamos se esta variante poderia estar associada a uma menor suscetibilidade genética para o LES ou nefrite lúpica.

Pacientes. Estudamos 136 pacientes (74.3% Caucasóides e 25.7% Afro-brasileiros) com LES (pelos critérios do *American College of Rheumatology*) (11) que eram acompanhados no Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 69 tinham nefrite lúpica. Uma amostra do sangue periférico destes pacientes foi coletada, bem como de 160 doadores voluntários sadios (63.7% Caucasóides e 36.3% Afro-brasileiros) que constituíram o grupo controle. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética institucional e todos os participantes assinaram termo de consentimento informado.

Métodos. O DNA do sangue periférico foi extraído de acordo com o método descrito por Lahiri e Nurnberger (17), sendo após realizada uma amplificação da região contendo a deleção delta32 por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Utilizaram-se os primers específicos senso 5'GGTCTTCATTACACCTGC3' e antisenso 5'AGGATTCCCGAGTAGCAGATG 3' da seguinte forma: 1µl de DNA (0,2-0,5µg), 2,5µl de tampão 10X contendo 30mM de MgCl₂, 0,2µl de Taq DNA polimerase (GIBCO 5U/µl), 10 mM de dNTP e 10pmol de cada primer (volume total da reação de 25µl). A PCR foi realizada da seguinte forma: 94°C por 3 minutos, 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto por 35 ciclos, e então 72°C por 5 minutos. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 3% com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. O resultado da amplificação da PCR foi um fragmento de 137 pb quando um alelo normal do CCR5 estava presente, enquanto a variante com deleção originou um fragmento de 105 pb.

Análise estatística. Os resultados foram analisadas em tabelas de contingência 2 x 2, e a comparação foi feita por testes não-paramétricos (qui-quadrado com correção de Yates). Para significância estatística nós consideramos um $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os pacientes com LES foram classificados de acordo com sua origem étnica em Caucasóides ou Afro-brasileiros, embora nenhuma diferença na frequência alélica do CCR5 tenha sido observada entre estes dois grupos, provavelmente devido à grande taxa de miscigenação da população brasileira. A distribuição dos alelos do CCR5 estava de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Não houve diferença na frequência alélica do CCR5 Δ 32 entre pacientes com LES e o grupo controle ($\chi^2 = 0.01$ com correção de Yates, $p=0.912$) ou entre pacientes com nefrite lúpica e controles ($\chi^2 = 0.00$, com correção de Yates, $p = 0,990$). O genótipo e a frequência alélica dos pacientes com LES (com e sem nefrite lúpica) e controles estão sumarizados na Tabela 1. Nenhum indivíduo homocigoto para a deleção CCR5 Δ 32 foi encontrado no grupo com LES ou controle.

Uma comparação entre os cinco diferentes subgrupos de nefrite lúpica com controles e pacientes com LES sem nefrite foi feita. Embora cada subgrupo tenha sido constituído por uma amostra pequena, não foram encontradas diferenças significativas entre estes e a frequência alélica do CCR5 Δ 32.

DISCUSSÃO

O LES é uma doença poligênica que tem demonstrado associação com o HLA classe II DR2 e DR3. A participação de outros genes, fora do cromossomo 6, na suscetibilidade genética ao LES está em investigação (12).

A frequência do alelo CCR5 Δ 32 varia entre os diferentes grupos étnicos, sendo zero entre africanos e populações nativas da América. Como as frequências desta variante são relativamente baixas mesmo em populações Caucasóides, não foi surpreendente a ausência de indivíduos homocigotos na população controle.

Nossos resultados demonstraram que a variante alélica CCR5 Δ 32 não parece estar envolvida na suscetibilidade genética ao LES ou à nefrite lúpica. Como nenhum homozigoto foi observado nos grupos, não podemos descartar que um indivíduo homozigoto estaria protegido contra o LES ou nefrite lúpica. Entretanto, devido à similaridade na frequência alélica entre os grupos estudados e o número de indivíduos com LES incluídos na nossa análise isto é pouco provável, e qualquer efeito protetor seria muito pequeno para ter significância estatística. Mesmo estratificando as diferentes classes de nefrite da OMS não obtivemos sucesso em demonstrar diferença entre pacientes e controles.

O papel do CCR5 na inflamação renal tem sido reportada em vários estudos, como tem sido exemplificado pela correlação entre nefrite e infiltrado celular expressando CCR5 nas biópsias (10, 13). A expressão do CCR5 parece ser importante na iniciação da nefrite lúpica em modelos animais (9); e, num estudo focado em células que expressavam CCR5 e doenças renais, os autores sugeriram um envolvimento desta molécula no sítio da inflamação (13). Além disso, um estudo com transplantados renais mostrou que a sobrevida dos transplantes foi significativamente maior em pacientes homozigotos para CCR5 Δ 32, sugerindo um papel do CCR5 na patogênese da rejeição de transplantes (14).

Há ainda indicação de um papel protetor da deleção do CCR5 Δ 32 na artrite reumatóide (15) e outras doenças auto-imunes e inflamatórias crônicas (16, 17). Contudo, nossos dados indicam claramente que mesmo se a molécula CCR5 pode ter um papel no processo inflamatório que ocorre no LES ou na nefrite lúpica, a variante alélica do CCR5 Δ 32 parece não estar associada com proteção ou prevenção destas condições. Esta observação sugere que diferentes e complexos processos fisiopatogênicos podem estar atuando nestas doenças. Uma explicação possível para esta diferença é que a sinóvia na doença reumatóide é infiltrada por

células T de memória com fenótipo funcional Th1; enquanto no LES, que é considerada uma doença mediada por uma resposta Th2, a participação do CCR5 pode ser menos importante. Futuros estudos com doenças mediadas por respostas inflamatórias Th1 e Th2 ajudarão e esclarecer este assunto.

Tabela 1. Genótipo e frequência alélica do CCR5 e $\Delta 32$ CCR5 em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), nefrite lúpica e controles

	Controles		LES		Nefrite	
	n	freq	n	freq	n	freq
Genótipo						
CCR5/CCR5	150	0,937	127	0,934	64	0,928
CCR5/ $\Delta 32$ CCR5	10	0,063	9	0,066	5	0,072
Total	160	1,000	136	1,000	69	1,000
Alelo						
CCR5	310	0,969	263	0,967	133	0,964
$\Delta 32$ CCR5	10	0,031	9	0,033	5	0,036
Total	320	1,000	272	1,000	138	1,000

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ward SG, Bacon K, Westwick J. Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity* 1998; 9:1-9.
2. Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1 beta and MIP1 alpha. *J Biol Chem* 1996; 271: 17161-17166.
3. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996; 381: 667-73.
4. Loetscher P, Uguccioni M, Bordolini L, Baggiolini M, Moser B. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391:344-5.
5. Zimmerman PA, Buckler-White A, Alkhatib G, Spalding T, Kubofcik J, Combadiere C, et al. Inherited resistance to HIV-1 infection conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5 – studies in populations with contracting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol Med* 1997; 3:23-26.
6. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86:367-77.
7. Zapico I, Coto E, Rodriguez A, Alvarez C, Torre JC, Alvarez V. CCR5 (chemokine receptor-5) DNA-polymorphism influences the severity of rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2000; 1(4): 288-9.
8. Gómez-Reino JJ, Pablos JL, Carreira PE, Santiago B, Serrano L, Vicario JL, et al. Association of rheumatoid arthritis with a functional chemokine receptor, CCR5. *Arthritis Rheum* 1999; 42:989-992.

9. Perez de Lema G, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, et al. Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12 (7): 1369-82.
10. Segerer S, Mack M, Regele H, Kerjaschki D, Schlöndorff D. Expression of the C-C chemokine receptor 5 in human kidney diseases. *Kidney Int* 1999; 56:52-64.
11. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-7.
12. Gulko PS, Winchester RJ. Genetics of Systemic Lupus Erythematosus. In: Kammer GM, Tsokos GC, editors. *Lupus: Molecular and Cellular Pathogenesis*. Totowa, NJ: Humana Press, Inc.; 1999:101-23.
13. Furuichi K, Wada T, Sakai N, Iwata Y, Yoshimoto K, Shimizu M, et al. Distinct expression of CCR1 and CCR5 in glomerular and interstitial lesions of human glomerular diseases. *Am J Nephrol* 2000; 20:291-9.
14. Fischereder M, Luckow B, Hoher B, Wüthrich RP, Rothenpieler U, Schneeberger H, et al. CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival. *Lancet* 2001; 357:1758-61.
15. Cooke SP, Forrest G, Venables PJ, Hajeer A. The delta32 deletion of CCR5 receptor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42:2732-3.
16. Hall IP, Wheatley A, Christie G, McDougall C, Hubbard R, Helms PJ. Association of CCR5 delta32 with reduced risk of asthma. *Lancet* 1999; 354:1264-65.

17. Sellebjerg F, Madsen HO, Jensen CV, Jensen J, Garred P. CCR5 delta32, matrix metalloproteinase-9 and disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000; 102:98-106.

APÊNDICES

1-CRITÉRIOS REVISADOS PARA A CLASSIFICAÇÃO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO DE 1997.

Critério	Definição
1-Eritema malar	Eritema malar fixo, plano ou elevado
2-Eritema discóide	Placas eritematosas elevadas com escamas queratóticas aderentes e espículas foliculares
3-Fotossensibilidade	Eritema cutâneo por reação não usual à exposição solar
4-Úlceras orais	Úlceras orais ou nasais, geralmente indolores
5-Artrite	Artrite não erosiva que afeta duas ou mais articulações periféricas.
6-Serosite	a) Pleurite: história convincente de dor pleurítica ou atrito auscultado pelo médico OU b) Pericardite: documentada por ECG, ou atrito ou evidência de derrame pericárdico.
7-Alteração renal	a) Proteinúria persistente (>0,5 g/d ou >3+) OU b) Sedimento com cilindros ou hemácias
8-Alteração neurológica	a) Convulsões (na ausência de outra causa) OU b) Psicose (na ausência de outra causa)
9-Alteração hematológica	a) Anemia hemolítica OU b) Leucopenia (<4.000/ml em 2 medidas) OU c) Linfopenia (<1.500/ml em 2 medidas) OU d) Trombocitopenia (<100.000/ml na ausência de drogas)
10-Alteração imunológica	a) Anti DNA OU b) Anti-Sm OU c) Anticorpos antifosfolipídios (anticardiolipina IgG ou IgM; ou anticoagulante lúpico) OU d) Teste falso positivo para Lues, durante 6 meses
11- Anticorpo antinuclear	Um título anormal do anticorpo antinuclear em qualquer momento da doença, na ausência de drogas que possam levar a lúpus droga relacionado

* Para o diagnóstico, deve haver a presença de 4 ou mais destes critérios.

2- CLASSIFICAÇÃO DA NEFRITE LÚPICA PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE

Classificação

- I - Glomérulo normal
 - a) Negativa por qualquer técnica
 - b) Normal por microscopia, mas depósito na microscopia eletrônica

 - II – Mesangial
 - a) Celularidade leve
 - b) Celularidade moderada

 - III – Glomerulonefrite focal
 - a) Lesões necrosantes ativas
 - b) Lesões esclerosantes ativas

 - IV – Glomerulonefrite difusa
 - a) Sem lesões segmentares
 - b) Com lesões necrosantes ativas
 - c) Com lesões esclerosantes ativas
 - d) Sem lesões esclerosantes

 - V – Glomerulonefrite membranosa
 - a) Glomerulopatia membranosa pura
 - b) Associada com lesões da classe II
 - c) Associada com lesões da classe III
 - d) Associada com lesões da classe IV

 - VI – Glomerulonefrite esclerosante avançada
-

3- TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

PROJETO: Estudo do polimorfismo do receptor de células T e análise de marcadores de superfície em linfócitos provenientes de indivíduos com doenças de fundo genético e/ou autoimune.

Pesquisador responsável: Dr. José Artur Bogo Chies

Laboratório de Imunogenética

Departamento de Genética - UFRGS

O presente projeto consiste da análise de polimorfismos, ao nível de DNA, de genes relacionados com o sistema imune, especificamente de genes do receptor de células T (TCR) e do receptor de quimiocinas CCR5. Este estudo tem como objetivo identificar marcadores moleculares que possam estar relacionados com o prognóstico de patologias autoimunes ou de fundo genético.

COMO SERÁ FEITO O ESTUDO?

Para a realização deste estudo será coletado sangue, do qual será extraído DNA total. Este DNA será submetido à técnicas de biologia molecular (PCR e enzimas de restrição) as quais não modificam ou alteram as características gênicas do DNA, mas possibilitam evidenciar possíveis polimorfismos genéticos.

O QUE SÃO POLIMORFISMOS GENÉTICOS?

Polimorfismos genéticos são as diferentes formas de « descrever » uma característica ao nível do DNA (um exemplo disto é a diferença na cor dos olhos das pessoas, resultado de um polimorfismo genético).

POR QUE ANALISAR ESTES POLIMORFISMOS?

Muitas vezes estes polimorfismos, mesmo não aparecendo fisicamente, podem dar indicações sobre a possibilidade de desenvolvimento de uma doença ou o tipo de tratamento a ser utilizado para prevenir ou tratar esta doença. Por exemplo, sabemos que pessoas que tem certos polimorfismos de um gene chamado *APO* desenvolvem mais facilmente doenças do coração e sabemos que estas mesmas pessoas poderão ser beneficiadas se tiverem uma dieta alimentar específica.

EXISTE ALGUMA VANTAGEM EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Para a maioria das patologias de fundo autoimune, como é o caso da artrite reumatóide e do lúpus eritematoso sistêmico, ainda não existem informações sobre a correlação de algum polimorfismo do TCR ou do CCR5 no desenvolvimento da patologia. Existe, portanto, a necessidade de amplos estudos que envolvam a análise do DNA de muitos indivíduos para que possamos definir se a presença de algum polimorfismo é determinante no desenvolvimento destas patologias. No caso de identificação de alguma característica, seja ela favorável ou desfavorável à autoimunidade, durante as análises do DNA, você será imediatamente informado e nos colocaremos à disposição para qualquer esclarecimento a respeito desta característica.

EXISTE ALGUMA DESVANTAGEM EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Este estudo envolve apenas uma coleta de sangue a nível laboratorial e o material obtido será estocado no Laboratório de Imunogenética da UFRGS sob a responsabilidade do Dr José Artur Bogo Chies. Este material só será utilizado para análises de polimorfismos de DNA sendo seu uso vetado para quaisquer outras finalidades. Asseguramos também que preservaremos sua privacidade e que, em

hipótese alguma, sua identidade será revelada, seja no decorrer de nossos estudos ou após o término destes.

HÁ A POSSIBILIDADE DE CONTINUIDADE DESTE ESTUDO?

O conhecimento das causas que levam ao desenvolvimento de doenças de fundo genético e/ou autoimune aumenta a cada dia, portanto existe a possibilidade de que novos polimorfismos, hoje não conhecidos venham a ser identificados no futuro. O presente estudo é, portanto, o passo inicial de uma série de análises (hoje centradas no TCR e no CCR5) que visam esclarecer os mecanismos de desenvolvimento destas patologias.

Favor assinalar com um X apenas uma das opções abaixo:

() Autorizo a utilização do sangue coletado APENAS para as análises de polimorfismos de DNA de genes do receptor de células T (TCR) e do CCR5.

() Autorizo a utilização do sangue coletado para as análises de polimorfismos de DNA de genes do receptor de células T (TCR) e do CCR5 e para análises de outros polimorfismos de DNA que possam vir a ser considerados relevantes dentro desta linha de pesquisa, desde que sob a responsabilidade do Dr. José Artur Bogo Chies.

Nome:

Nº do prontuário:

Assinatura do paciente:

Nome do coletador:

Assinatura:

Data e local da coleta:

4 – LISTA DO GENÓTIPO DOS PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO

SISTÊMICO (homo=homozigoto: não há alelo para deleção CCR5 Δ 32; hetero=

heterozigoto: há presença de um alelo para a deleção).

1	homo	36	homo
2	homo	37	homo
3	homo	38	homo
4	homo	39	homo
5	hetero	40	homo
6	homo	41	homo
7	homo	42	homo
8	homo	43	homo
9	homo	44	homo
10	homo	45	homo
11	homo	46	homo
12	homo	47	homo
13	homo	48	homo
14	homo	49	homo
15	homo	50	homo
16	homo	51	homo
17	homo	52	homo
18	homo	53	homo
19	homo	54	homo
20	hetero	55	homo
21	homo	56	homo
22	homo	57	homo
23	homo	58	homo
24	homo	59	homo
25	homo	60	homo
26	hetero	61	homo
27	homo	62	homo
28	homo	63	homo
29	hetero	64	hetero
30	homo	65	hetero
31	homo	66	homo
32	homo	67	homo
33	homo	68	homo
34	homo	69	homo
35	homo	70	homo

71	homo	106	homo
72	homo	107	homo
73	homo	108	homo
74	homo	109	homo
75	homo	110	homo
76	homo	111	homo
77	homo	112	homo
78	hetero	113	homo
79	homo	114	homo
80	homo	115	homo
81	homo	116	homo
82	homo	117	homo
83	homo	118	homo
84	homo	119	homo
85	homo	120	homo
86	homo	121	homo
87	homo	122	homo
88	homo	123	hetero
89	homo	124	homo
90	homo	125	homo
91	homo	126	homo
92	homo	127	homo
93	homo	128	homo
94	homo	129	homo
95	homo	130	hetero
96	homo	131	homo
97	homo	132	homo
98	homo	133	homo
99	homo	134	homo
100	homo	135	homo
101	homo	136	homo
102	homo		
103	homo		
104	homo		
105	homo		

