

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS CCR2-64I, CCR5-59353, CCR5-59356, CCR5-59402 e CCR5-59653 EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO DO SUL DO BRASIL**

**Juliana da Silveira Schauren**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Orientador: José Artur Bogo Chies**

**Porto Alegre  
Março de 2013**

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

### **INSTITUIÇÕES:**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Biociências/ Departamento de Genética/ Laboratório de Imunogenética

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE/UFRGS

Serviço de Reumatologia/ Departamento de Medicina Interna da Faculdade de Medicina do Rio Grande do Sul

### **FONTES FINANCIADORAS:**

CAPES

CNPQ

FAPERGS

## **AGRADECIMENTOS**

Mais uma etapa da minha vida se passou, e eu não poderia deixar de agradecer às pessoas que estiveram comigo nesse período e que me apoiaram.

Primeiramente, agradeço ao meu orientador Zeca por ter aceitado me orientar desde a iniciação científica e por tudo que ele me ensinou nestes anos.

Meus queridos colegas, ex-colegas e amigos do lab. merecem aqui um agradecimento muito especial. Mila, Dine, Tássia, Jacque, Mau, Nayê, Fran, Ana, Tiago V., Pietra, Pri, Gio, Bi, Lia, Gustavo, Meg, Dinler, Maurício R., Dani, Tiago D., Paula, Gabi, Bruno e Fê R.. Muito obrigada pelo companheirismo, pela amizade, pelos ensinamentos e pelas alegrias que vocês me proporcionaram durante este período. Vocês foram muito importantes pra mim!

Agradeço também aos meus amigos, colegas e professores do PPGBM que sempre que eu precisei foram muito solícitos e também me proporcionaram muitas amizades, em especial: Sídia, pessoal do lab. dos mamíferos, Caio, Clévia, Diego, Guilherme, Gabi, Juliana, Zuleide, Angélica e Mari.

Agradeço também às pessoas que me aturaram nesse período fora da UFRGS:

Minhas biomédicas lindas e amadas: Mila, Fezis, Paula, Ana, Sche e Tássia e as anexas, Clá e Paty.

Meus amigos do vôlei que fizeram minhas segundas-feiras muito mais felizes!

Minhas amigas de toda a vida que eu amo demais: Nanda, Mari e Ana!

Meu amor, Juliano por aguentar namorar comigo a distância nestes 2 anos, me dar carinho e me suportar nestes últimos dias de dedicação total.

Minha família que é tudo pra mim, em especial, meu pai que sempre apoiou minhas decisões (quando elas estava certas), meu irmão que sempre me incomodou (mas eu sei que é só porque ele me ama muito) e minha mãe que sempre fez o possível e o impossível pra me fazer feliz. Amo vocês!!! Obrigada por aguentarem minhas ausências, meu mau humor, meus chilikues, minhas crises de choro de ódio mortal do meu notebook, enfim, por tudo.

**MUITO OBRIGADA A TODOS!!!**

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMO.....	9
ABSTRACT .....	11
1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1. Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES).....	13
1.2. Epidemiologia .....	13
1.3. Manifestações clínicas do LES.....	15
1.4. Etiologia.....	16
1.4.1. Fatores genéticos.....	17
1.4.2. Fatores ambientais.....	19
1.4.3. Fatores imunológicos .....	20
1.5. Patogênese do LES.....	20
1.5.1. Defeitos na apoptose .....	20
1.5.2. Defeitos no sistema do complemento .....	22
1.5.3. Desregulação de linfócitos T .....	23
1.5.4. Hiperreatividade de linfócitos B.....	25
1.5.5. Quimiocinas e seu envolvimento no LES .....	27
1.6. Receptores de quimiocinas .....	28
1.6.1. CCR2 .....	31
1.6.2. CCR5 .....	32
2. OBJETIVOS .....	35
2.1. Objetivo geral .....	35
2.2. Objetivos específicos.....	35
3. ARTIGO CIENTÍFICO .....	36
4. DISCUSSÃO .....	61
REFERÊNCIAS:.....	66

ANEXO 1.....	79
ANEXO 2.....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACR: *American College of Rheumatology*

Anti-dsDNA: Anticorpo contra fita dupla de Ácido Desoxirribonucleico

Anti-Ro/SSA – Anticorpo contra o antígeno Ro (proteína pequena ligada ao RNA)

APCs: Células Apresentadoras De Antígenos

BANK1: *B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1*

BLK: Tirosina Quinase do Linfócito B

CCR2 e 5: Receptor de Quimiocinas do tipo CC 2 e 5

CD: *Cluster De Diferenciação*

CD40L ou CD154: Ligante de CD40

CRP: Proteína C Reativa

CTLA4: Antígeno 4 de Linfócito T Citotóxico

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EBNA: Proteína do Vírus Epstein-Barr

ETS1: *V-ETS avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*

Fab: Porção de Ligação ao Antígeno

Fc: Fração Constante (cristalizável)

FcγR: Receptores para Imunoglobulina Gama

GWASs: Estudos de Associação Genômica

HH: Haplogrupos Humanos

HIV-1: Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA DR/DQ: Antígeno Leucocitário Humano DQ/DR

HLA-DRB1: Antígeno de Histocompatibilidade Pertencente ao Antígeno Leucocitário Humano de Classe II

IFIH1: *Interferon-induced Helicase C domain-containing protein 1*

IFNα: Interferon alfa

IFN-γ: Interferon gama

Ig: Imunoglobulina

IKZF1: *IKAROS family zinc finger 1*

IL: Interleucina

IP-10: Proteína Induzível por IFN- $\gamma$   
IRF: Fator Regulador de Interferon  
ITGAM: Integrina Alfa M  
ITPR3: Receptor de Inositoltrifosfato tipo 3  
JAZF1: *Juxtaposed with another zinc finger gene 1*  
LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico  
LRRC18-WDFY4: *Leucine-rich repeat containing 18-WD repeat and FYVE domain-containing protein 4*  
LYN: *V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral-related oncogene homolog*  
MAPK: Proteína Quinase Ativada por Mitógeno  
MASPs: Serinoproteases Associadas a MBL  
MBL: Lectinas Ligadoras de Manose  
MCP-1 ou CCL2: *Monocyte Chemotactic Protein-1*  
MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade  
MIP: Proteína Inflamatória de Macrófagos  
mRNAs: RNAs mensageiros  
mTOR: *Mammalian Target of Rapamycin*  
NCF2: Fator Citosólico de Neutrófilos 2  
NK: Natural Killer  
PDCD1: Morte Celular Programada 1  
pDCs: Células Dendríticas Plasmocitóides  
PRDM1-ATG5: *PR domain zinc finger protein 1- autophagy-related 5 homolog*  
PTPN22: *Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 22*  
PTX3: pentraxina longa 3  
PXK: *PX domain containing serine/threonine kinase*  
CCL5 ou RANTES: *Regulated and Normal T Cell Expressed and Secreted ou Chemokine (C-C motif) ligand 5*  
RasGRP3: *RAS guanyl releasing protein 3*  
RNA: Ácido Ribonucleico  
SAP: Componente Amiloide P do Soro  
SDI: Índice de Dano do SLICC/ACR  
SLAM: Medida de Atividade do Lúpus Sistêmico

SLC15A4: Membro 4 da Família 15 de Carreadores de Sóluto  
SLEDAI: Índice de Atividade do Lúpus Eritematoso Sistêmico  
SLICC: *Systemic Lupus International Collaborating Clinics*  
STAT4: Transdutor de Sinais e Ativador da Transcrição  
TCR: Receptor de Linfócitos T  
TGF- $\beta$ : Fator de Transformação do Crescimento - Beta  
TLRs: Receptores do Tipo Toll  
TNFAIP3: Proteína Induzida por Fator de Necrose Tumoral Alfa  
TNFSF4: Membro 4 da Superfamília de Receptores de Fatores de Necrose Tumoral  
TNIP1: Proteína 1 que Interage com TNFAIP3  
TYK2: Tirosina Quinase 2  
UBE2L3: *Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3*  
UHRF1BP1: Proteína Ligadora de UHRF 1  
XKR6: *XK, Kell blood group complex subunit-related family, member 6*



## RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune inflamatória crônica que possui uma etiopatogênese complexa. Diversos fatores participam da patogênese da doença, dentre eles alterações no balanço de citocinas e quimiocinas. As quimiocinas e seus receptores são fundamentais na regulação da migração de leucócitos durante a inflamação e acredita-se que elas possam ter um papel importante na patogênese de doenças autoimunes, inclusive no LES. Diversos estudos abordaram o papel de quimiocinas e seus receptores no LES, porém, principalmente se tratando dos receptores de quimiocinas CCR5 e CCR2, não existe um consenso. Devido à falta de consenso em relação ao papel dos receptores de quimiocinas na patogênese do LES e considerando a necessidade de mais estudos nesta área, o presente trabalho tem por objetivo investigar o possível papel de polimorfismos na região promotora do *CCR5* no desenvolvimento do LES, comparando as frequências dos genótipos e haplótipos entre pacientes e controles, e analisar o possível envolvimento destes polimorfismos nas manifestações clínicas/laboratoriais da doença. O estudo incluiu 382 pacientes com LES (289 Euro-descendentes e 93 Afro-descendentes) e 375 controles (243 Euro-descendentes e 132 Afro-descendentes) genotipados para os polimorfismos CCR2-64I G>A (rs1799864), CCR5-59353 C>T (rs1799988), CCR5-59356 C>T (rs41469351), CCR5-59402 A>G (rs1800023) e CCR5-59653 C>T (rs1800024) através de PCR-RFLP e sequenciamento, respectivamente. Dados prévios de nosso grupo em relação ao CCR5delta32 foram incluídos no estudo para a inferência dos haplótipos e como um possível fator de confusão na regressão binária logística. Os resultados obtidos indicam que, em pacientes Euro-descendentes, as frequências reduzidas o polimorfismo CCR5delta32 e o haplótipo HHG\*2 observadas em pacientes quando comparados com controles foram associadas com a doença ( $p=0,001$ ; OR 3,5; 95%CI 1,6-7,5 e 2,0% vs. 7,2%;  $p_{\text{residual}}=2,9E-5$ ; respectivamente). Em pacientes Afro-descendentes, as frequências dos haplótipos HHA/HHB, HHC e HHG\*2 foram diferentes em pacientes e controles (10% vs. 20,5%,  $p_{\text{residual}} = 0,003$ ; 29,4% vs.

17,4%;  $p_{\text{residual}}=0,003$  e 3,9% vs. 0,8%;  $p_{\text{residual}}=0,023$ ; respectivamente). Em relação às manifestações clínicas da doença, a presença do CCR5delta32 foi confirmada como um fator de susceptibilidade para nefrite classe IV em pacientes Afro-descendentes e no grupo de pacientes como um todo ( $p_{\text{corrigido}}=0,012$ ; OR 3,0; 95%CI 3,0-333,3 e  $p_{\text{corrigido}}=0,0006$ ; OR 6,8; 95%CI 1,9-2,48; respectivamente). Em conclusão, o presente estudo indica que polimorfismos na região promotora do CCR5 podem atuar como modificadores no LES. Os resultados observados reforçam o papel do polimorfismo CCR5delta32 como um fator de proteção para o desenvolvimento do LES em Euro-descendentes e como um fator de susceptibilidade à nefrite classe IV em pacientes Afro-descendentes. Além disto, também foram descritos a redução da frequência dos haplótipos HHA/HHB e o aumento da frequência dos haplótipos HHC e HHG\*2 em pacientes Afro-descendentes, que possivelmente podem estar associados com uma maior expressão do CCR5 em subtipos específicos celulares e com uma menor expressão deste receptor de maneira geral.

**Palavras-chave:** CCR5, polimorfismos da região promotora do CCR5, CCR2, Lúpus, Lúpus Eritematoso Sistêmico.

## ABSTRACT

Systemic Lupus erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory autoimmune disease, characterized by a complex etiopathogenesis. Many factors are known to participate in the pathogenesis of SLE, including alterations in the cytokines or chemokines balance. Chemokines and their receptors are central players in the regulation of leucocytes chemotaxis in inflammation and they are thought to have an important role in the pathogenesis of autoimmune diseases, including SLE. Several studies have addressed the role of chemokines and their receptors in SLE, however there is no consensus regarding their involvement on the pathogenesis of the disease. Given the lack of consensus considering the role of chemokine receptors in SLE pathogenesis and the need for more studies in this area, the present work aims to investigate a possible role of the CCR5 promoter region polymorphisms in the development of SLE comparing the frequencies of the genotypes and haplotypes with ethnically matched controls and analyze if there is a possible involvement of the polymorphisms in the clinical outcome of the disease. This study included 388 SLE patients (289 classified as European-derived and 93 as African-derived) and 375 controls (243 European-derived and 132 African-derived) genotyped for the CCR2-64I G>A (rs1799864), CCR5-59353 C>T (rs1799988), CCR5-59356 C>T (rs41469351), CCR5-59402 A>G (rs1800023) and CCR5-59653 C>T (rs1800024) polymorphisms through PCR-RFLP and direct sequencing, respectively. Previous data from CCR5delta32 were included in the study to infer the haplotypes and also as a possible confounding factor in the binary logistic regression. Our results indicated that, in European-derived patients, CCR5delta32 and the HHG\*2 haplotype reduced frequencies in patients when compared to controls were associated with the disease ( $p=0.001$ ; OR 3.5; 95%CI 1.6-7.5 and 2.0%, vs. 7.2% residual  $p= 2.9E-5$ , respectively). In African-derived patients, the HHA/HHB, HHC and HHG\*2 haplotype frequencies differed between patients and controls (10% vs. 20.5%, residual  $p= 0.003$ ; 29.4% vs. 17.4%, residual  $p=0.003$  and 3.9% vs. 0.8%, residual  $p=0.023$ ; respectively). Considering the clinical manifestations of the disease, CCR5delta32 presence was

confirmed as a susceptibility factor to class IV nephritis in the African-derived group and when patients were considered together ( $p_{\text{corrected}}=0.012$ ; OR 3.0; 95%CI 3.0-333.3 and  $p_{\text{corrected}}= 0.0006$ ; OR 6.8; 95%CI 1.9-2.48, respectively). In conclusion, this study indicates that *CCR5* promoter polymorphisms are important disease modifiers in SLE. Present data reinforces *CCR5*delta32 polymorphism as a protective factor for the development of the disease in European-derived patients and as a susceptibility factor for class IV nephritis in African-derived patients. Furthermore, we also describe a reduced frequency of HHA/HHB and an enhanced frequency of HHC and HHG\*2 haplotypes in our African-derived patients, which potentially could reflect in a higher expression of *CCR5* in specific cell subsets and in a lower expression of *CCR5* overall.

**Keywords:** *CCR5*, *CCR5* promoter polymorphisms, *CCR2*, Lupus, Systemic Lupus Erythematosus.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)**

As primeiras descrições desta doença relatavam lesões na pele semelhantes à mordida de um lobo (Hochberg, 2003). Neste contexto, a palavra lúpus, derivada da palavra em latim “lupus” que significa lobo, foi utilizada para dar nome à enfermidade. Apesar de não haver relação entre a doença Lúpus e a mordida de lobo, esta denominação se manteve.

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune inflamatória crônica que pode acometer diversos tecidos. A doença é caracterizada pela atividade anormal de células B e T (Dörner, 2011; Moulton, 2011), pela produção de autoanticorpos e pela formação e deposição de imunocomplexos. O LES pode afetar praticamente qualquer órgão, sendo mais grave quando afeta os rins e o sistema nervoso (Borchers, 2010). A gravidade da doença difere entre os pacientes, variando desde apenas um pequeno envolvimento cutâneo até o dano grave de órgãos, e a atividade da doença varia entre períodos de atividade e remissão (Borchers, 2010). A doença afeta principalmente mulheres em idade reprodutiva, podendo no entanto afetar pessoas de ambos gêneros e em qualquer idade.

### **1.2. Epidemiologia**

A determinação da incidência e prevalência do LES se torna difícil por diversos fatores. Muitos dos estudos são baseados em populações pequenas, baseados em intervalos curtos de tempo e há ausência de um padrão de diagnóstico, portanto, dados de incidência e prevalência do LES devem ser interpretados com muita cautela (Borchers, 2010). De forma geral, a incidência do LES varia de 1,0/100.000 habitantes/ano na Dinamarca (Laustrup, 2009) a 8,7/100.000 habitantes/ano no nordeste do Brasil (Vilar, 2002). Dados de incidência de países com sistemas públicos de saúde costumam ser mais confiáveis e variam de 1,0 a 4,8/100.000 habitantes/ano (Borchers, 2010). A

prevalência do LES varia muito, podendo chegar a 207,0/100.000 em Afro-caribenhos (Hopkinson, 1994).

No Brasil, apesar de existir um sistema público de saúde, existem poucos dados de incidência e prevalência divulgados em revistas indexadas e os dados publicados envolvem pacientes dos sistemas de saúde público e privado. Vilar e colaboradores observaram uma incidência de 8,7/100.000 habitantes/ano (14,1/100.000 habitantes/ano em mulheres e 2,2/100.000 habitantes/ano em homens) em Natal, uma cidade do nordeste brasileiro (Vilar, 2002). Neste estudo, a média de idade foi 31,8 anos em mulheres e 35,0 anos em homens. Em um estudo recente realizado no Sul do Brasil por Nakashima e colaboradores, a incidência observada foi de 4,8/100.000 habitantes/ano, sendo que todas as pacientes eram do sexo feminino, e a média de idade foi de 41,5 anos (Nakashima, 2011).

A incidência de casos varia entre os gêneros e, em geral, a proporção é em torno de 9 mulheres afetadas para cada homem afetado. Além da variação no gênero, existe uma grande variação entre etnias. Em um estudo realizado nos Estados Unidos da América, as taxas de incidência em “brancos” foram de 0,4 em homens e 3,5 em mulheres e em Afro-americanos foram de 0,7 em homens e 9,2 em mulheres, evidenciando a diferença entre gênero e etnia (McCarty, 1995). Em relação ao continente Africano, aparentemente, os africanos nativos parecem apresentar menores taxas de incidência e prevalência de LES do que Afro-descendentes de populações miscigenadas, no entanto, estas menores taxas podem ser uma consequência da falta de estudos nesta área (Borchers, 2010). Este aparente “gradiente” vem sendo debatido devido à publicação de estudos recentes que indicam que o LES não é tão raro na África como se pensava anteriormente (Wadee, 2007; Adelowo, 2009).

Apesar de diversos tratamentos melhorarem o prognóstico da doença, o LES não tem cura, e seu curso pode variar desde remissão permanente ao óbito. Um grande estudo europeu analisou uma coorte de 1.000 pacientes durante 10 anos (Cervera, 2003). Este estudo observou uma probabilidade de sobrevivência de 92% em 10 anos. Este número foi menor em pacientes que apresentaram envolvimento renal e as causas de morte mais comuns nos primeiros 5 anos

foram LES ativo e infecções. Em outro estudo realizado nos Estados Unidos da América, foi observado que pacientes negros (que tinham maior envolvimento renal) e pacientes com as piores condições socioeconômicas, apresentavam uma doença mais agressiva e maior mortalidade (Reveille, 1990) citado por (O'Neill, 2010). As taxas de sobrevivência vêm aumentando nos últimos 40 anos (O'Neill, 2010). Essa melhora nas taxas, muito provavelmente, deve-se à evolução da medicina, tanto no desenvolvimento de tratamentos quanto no aperfeiçoamento dos métodos diagnósticos.

### **1.3. Manifestações clínicas do LES**

O LES é uma doença reumatológica, entretanto suas manifestações clínicas podem ser muito amplas e atingem muito mais do que apenas o tecido conjuntivo. Para facilitar o diagnóstico, critérios de classificação foram criados pelo *American College of Rheumatology* (ACR) em 1982 (Tan, 1982) e revisados em 1997 (Hochberg, 1997). Segundo esta classificação, para ser diagnosticado com LES, o indivíduo deve manifestar no mínimo 4 dentre os 11 critérios definidos pelo ACR (ANEXO 1), serialmente ou simultaneamente, em qualquer intervalo de observação. Em 2012, uma nova revisão foi publicada, baseada no SLICC (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics*) com o intuito de melhorar os critérios de classificação da doença (Petri, 2012). Nesta última versão, o paciente deve conter no mínimo 4 critérios (ANEXO 2), incluindo pelo menos 1 critério clínico e 1 critério imunológico OU o paciente deve ser diagnosticado com nefrite comprovada por biópsia na presença de anticorpos antinucleares ou anticorpos contra fita dupla de DNA (anti-dsDNA).

Para medir o índice de atividade da doença não há consenso, podendo ser utilizados o Índice de Atividade (SLEDAI ou SLEDAI-2K se utilizada a versão revisada) (Bombardier, 1992; Gladman, 2002), o Consenso Europeu para Medida de Atividade do Lúpus (ECLAM) (Vitali, 1992) e a Medida de Atividade do Lúpus Sistêmico (SLAM, SLAM-r, Bilag ou Bilag 2004 se a versão revisada é usada) (Symmons, 1988; Liang, 1989; Bae, 2001; Isenberg, 2005; Borchers, 2010). Para

medir o dano do LES é utilizado o SLICC/ACR “Damage Index” (SDI) (Gladman, 1996).

As manifestações mais comuns do LES são as renais, imunológicas, cutâneas, conjuntivas, hematológicas e neurológicas. Estas manifestações também podem variar de acordo com a etnia do paciente (Lau, 2006). Um exemplo desta variação ocorre na nefrite lúpica, na qual a ascendência africana é um conhecido fator de risco, inclusive em Afro-descendentes do norte do Brasil (Pedroza, 2011). A nefrite lúpica é uma das manifestações mais graves do LES, ocorre em torno de 50% dos pacientes e é associada a um prognóstico ruim (Borchers; Guo). Ela pode ser dividida em seis classes, que podem ser diferenciadas por biópsia renal: classe I (mesangial mínima), II (mesangial proliferativa), III (focal), IV (difusa), V (membranosa) e VI (esclerosante avançada) (Weening, 2004). Dentro desta classificação, a classe I é considerada a mais leve e a classe IV é a classe que confere o pior prognóstico.

Os principais sintomas do LES são fadiga, dores de cabeça, articulações dolorosas ou inchadas, febre, anemia, edemas, dor no peito ao inspirar o ar profundamente, eritema em forma de borboleta no rosto, fotosensibilidade, perda de cabelo, problemas de coagulação do sangue, dedos brancos ou azuis no frio (fenômeno de Raynaud) e úlceras na boca ou nariz. Por ser uma doença muito heterogênea, o LES é frequentemente confundido com outras doenças, portanto é sempre importante que o paciente procure um reumatologista na presença de um ou mais destes sintomas.

Devido à heterogeneidade do LES, o tratamento deve ser indicado de acordo com as características da doença que o paciente apresenta. Em geral, os medicamentos mais utilizados no LES são os anti-inflamatórios não esteroidais, os antimaláricos, os glicocorticoides e os imunossupressores (Tsokos, 2011), além disto, o tratamento sintomático também é importante. Novas terapias vêm sendo desenvolvidas com o intuito de serem menos tóxicas e mais efetivas (Tsokos, 2011).

#### **1.4. Etiologia**



Os estudos que existem até hoje indicam que o LES é uma doença genética complexa que necessita atingir um limiar para sua expressão, entretanto, a variância nesta expressão indica que outros fatores, como ambientais, imunológicos e epidemiológicos, também afetam as manifestações clínicas da doença (Croker, 2005).

O LES se desenvolve durante um período de tempo que pode levar anos. Sugere-se que os seguintes passos ocorram: a) predisposição genética, b) gênero e fatores de predisposição adicionais, c) estímulos ambientais que desencadeiam respostas imunológicas, d) surgimento de autoanticorpos, e) falha na regulação dos autoanticorpos pelos linfócitos T e B e início das manifestações clínicas, f) inflamação crônica e dano oxidativo como causas de lesão tecidual (Gualtierotti, 2010).

A seguir serão descritos os principais fatores envolvidos na etiologia do LES:

#### **1.4.1. Fatores genéticos**

Estudos com gêmeos indicam que o LES é causado tanto por fatores genéticos como por fatores ambientais (Block, 2006). A taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos é de 24%, enquanto em gêmeos dizigóticos esta taxa de concordância é de 2% (Deapen, 1992). No entanto, segundo Croker e Kimberly, a taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos varia de 24-58%, enquanto irmãos fraternos tem uma taxa de concordância de 10% (Croker, 2005).

Muitos genes de predisposição ao LES são conhecidos. Na tabela 1 são descritos os principais genes de risco para o LES e seu potencial impacto funcional.

**Tabela 1:** Principais genes associados ao desenvolvimento do LES. Modificado de Gualtierotti e colaboradores (Gualtierotti, 2010).

<b>Genes de risco para o desenvolvimento de LES</b>	<b>Potencial impacto funcional</b>
HLA DR/DQ	Apresentação de antígenos
C1q, CRP, MBL e FCγR2A/3A/3B	Remoção de resíduos (material apoptótico e imunocomplexos)
BLK, CTLA4; Stat 4; PDCD1, PTPN22, FCγR2B, TCRζ	Funcionamento das células do sistema imunológico
IRF3, IRF5; TYK2	Imunidade inata
IL6; IL10; TNF-α	Citocinas
ITPR3	Geração de energia
ITGAM	Adesão leucócitos à células endoteliais

Até o ano de 2012, os Estudos de Associação Gênômica (GWASs) identificaram mais de 30 loci associados ao LES (Guerra, 2012). A heterogeneidade clínica da doença é refletida pela diversidade de vias que contém os loci descritos pelos estudos genéticos, tais como a via da apoptose, a resposta imune inata, a ubiquitinação e a fagocitose. Dentre os loci reportados, muitos atuam no sistema imune e estão envolvidos tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Entretanto, apesar de os GWASs serem responsáveis por um grande passo na descoberta de genes envolvidos na susceptibilidade ao LES, os loci até hoje descritos respondem por menos de 10% da herdabilidade genética da doença (Gateva, 2009).

Os loci identificados por terem atingido significância estatística ( $1.0E-8$ ) em GWAS são: *ITGAM* (integrina alfa M), *FcyR* (Receptores para imunoglobulina gama), *PRDM1-ATG5* (*PR domain zinc finger protein 1- autophagy-related 5 homolog*), *TNFAIP3* (Proteína Induzida por Fator de Necrose Tumoral Alfa), *TNIP1* (Proteína 1 que Interage com TNFAIP3), *UBE2L3* (*Ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3*), *ETS1* (*V-ETS avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*), *IKZF1* (*IKAROS family zinc finger 1*), *CD44*, *BANK1* (*B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1*), *BLK* (Tirosina Quinase do Linfócito B), *LYN* (*V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral-related oncogene homolog*), *RasGRP3* (*RAS guanyl releasing protein 3*), *NCF2* (Fator Citosólico de Neutrófilos 2), *STAT4* (Transdutor de Sinais e Ativador da Transcrição), *PTPN22* (*Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22*), *TNFSF4* (Membro 4 da Superfamília de Receptores de Fatores

de Necrose Tumoral), *HLA-DRB1* (antígeno de histocompatibilidade pertencente ao Antígeno Leucocitário Humano de classe II), *SLC15A4* (membro 4 da Família 15 de Carreadores de Solutos), *IRF5* (Fator Regulador de Interferon-5), *IRF7* (Fator Regulador de Interferon-7), *IRF8* (Fator Regulador de Interferon-8), *IFIH1* (*Interferon-induced helicase C domain-containing protein 1*), *TYK2* (Tirosina Quinase 2), *LRRC18-WDFY4* (*Leucine-rich repeat containing 18-WD repeat and FYVE domain-containing protein 4*), *PXK* (*PX domain containing serine/threonine kinase*), *JAZF1* (*Juxtaposed with another zinc finger gene 1*), *UHRF1BP1* (Proteína Ligadora de UHRF 1), *XKR6* (*XK, Kell blood group complex subunit-related family, member 6*), *IL10* (Interleucina 10) (Gateva, 2009; Guerra, 2012). Estes loci de risco podem ser categorizados dentro de diferentes vias potencialmente envolvidas na patogênese do LES que serão descritas no item 1.5.

Convém ressaltar que, apesar de muitos genes envolvidos na susceptibilidade ao LES terem sido encontrados, em geral, eles têm efeitos pequenos no risco da doença (OR 1,3 - 2,2), pouco se sabe sobre as interações gene-gene e gene-ambiente e existe pouca informação sobre como as manifestações clínicas da doença se correlacionam com estas variantes genéticas (Gualtierotti, 2010). Além disso, desde a descoberta de que a epigenética e os microRNAs podem ter um papel na patogênese do LES, o estudo das bases genéticas do LES se tornou cada vez mais complexo (Gualtierotti, 2010).

#### **1.4.2. Fatores ambientais**

Fatores ambientais como infecções, por exemplo, malária e parasitas endêmicos, podem modular a resposta do sistema imunológico gerando proteção contra doenças autoimunes como o LES (Borchers, 2010). Por outro lado, em indivíduos geneticamente predispostos, fatores ambientais podem servir como gatilho para o desenvolvimento da doença (Borchers, 2010). Este é o caso descrito para infecções virais por parvovírus (Aslanidis, 2008) e citomegalovírus (Sekigawa, 2002). Além disso, certas proteínas virais semelhantes a antígenos próprios podem causar reação cruzada com antígenos próprios como, por

exemplo, a proteína EBNA do vírus Epstein-Barr que pode gerar uma reação cruzada com o antígeno próprio Ro, um alvo comum para autoanticorpos no LES (Toussiro, 2008).

O LES também pode ser induzido por medicamentos, sendo os mais conhecidos a procainamida, a hidralazina e a quinidina (Rahman, 2008). A exposição à luz ultravioleta, a compostos químicos, como, por exemplo, toxinas presentes no cigarro, e a alimentos também são fatores ambientais conhecidos (Herrmann, 2000; Gualtierotti, 2010).

A taxa elevada de mulheres que desenvolvem o LES e a exacerbação da doença durante o período reprodutivo deixam clara a influência hormonal no desenvolvimento da doença (Schwartzman-Morris). Estudos relatam a influência do estrógeno e de seus receptores no LES, porém ainda são necessários muitos estudos para que os mecanismos pelos quais estes hormônios atuam no desenvolvimento da doença sejam esclarecidos (Kassi, 2010).

#### **1.4.3. Fatores imunológicos**

Pacientes com LES manifestam uma série de defeitos no sistema imunológico que levam a uma perda da tolerância imunológica. De forma geral, os principais defeitos presentes em pacientes e em modelos murinos são a) alta capacidade de produção de autoanticorpos, b) falta de regulação de linfócitos B e T e c) falha nos mecanismos de remoção de autoantígenos e imunocomplexos (Mageed, 2003). A maneira pela qual estes defeitos no sistema imunológico contribuem para a patogênese da doença será discutida a seguir no item 1.5..

### **1.5. Patogênese do LES**

#### **1.5.1. Defeitos na apoptose**

Em pacientes com LES, um grande número de células apoptóticas se acumula em diversos tecidos, inclusive nos centros germinativos (Shao, 2011). Falhas no mecanismo de remoção destas células podem levar ao acúmulo e precipitação de restos celulares, provocando uma resposta inflamatória crônica

que pode levar à perda da tolerância ao próprio e, conseqüentemente, à autoimunidade (Munoz, 2010; Shao, 2011).

A apoptose é o processo de morte celular programada que pode ser desencadeado por estímulos intrínsecos ou extrínsecos (Munoz, 2010). Uma característica marcante da apoptose é a formação de vesículas cobertas por membrana na superfície celular (Munoz, 2010). Estas vesículas impedem que o material do interior da célula circule livremente pelo organismo agindo com estímulo para o sistema imune. As células apoptóticas secretam ativamente sinais que atraem macrófagos e repelem neutrófilos (Lauber, 2004; Chalaris, 2007; Gude, 2008; Peter, 2008; Bournazou, 2009; Elliott, 2009). Os macrófagos reconhecem principalmente os resíduos de fosfatidilserina externalizados pela célula apoptótica, há um remodelamento de seu citoesqueleto e a célula apoptótica é fagocitada (Fadok, 1992). Após a fagocitose da célula apoptótica, os macrófagos liberam citocinas anti-inflamatórias como TGF- $\beta$  (fator de transformação do crescimento - beta) e IL10 que criam um ambiente anti-inflamatório nos locais de morte celular (Voll, 1997). Uma das principais características da apoptose consiste no fato de a membrana celular permanecer intacta, porém, se o processo de remoção dos restos celulares da célula que sofreu apoptose falhar, a célula apoptótica entra em processo de necrose secundária e há liberação de seu conteúdo intracelular podendo ocasionar perda da tolerância imunológica (Peter, 2008; Munoz, 2010). A liberação de autoantígenos desencadeia a produção de citocinas inflamatórias e interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ), o que promove a perda de tolerância de linfócitos, a produção de autoanticorpos e a deposição de imunocomplexos (Munoz, 2010; Guerra, 2012). Estes imunocomplexos podem se ligar a receptores de baixa afinidade Fc $\gamma$ RIIa, expressos em células dendríticas plasmocitóides (pDCs) (Guerra, 2012). Quando endocitados pelas pDCs, o DNA, o RNA e as proteínas associadas a estes ácidos nucléicos apresentados por estes imunocomplexos ativam os receptores Toll-like 7/9 (TLR7/9) que estimulam a produção de IFN pelas pDCs (Elkon; Marshak-Rothstein, 2007). Esta produção de IFN propaga a inflamação crônica e a perda da tolerância, que são características marcantes do LES (Guerra, 2012).

Polimorfismos em genes envolvidos na via da apoptose como *ITGAM*, que codifica a cadeia  $\alpha$  da integrina- $\alpha$ M $\beta$ 2 envolvida na fagocitose e adesão de leucócitos, e *FC $\gamma$ R*, receptores da porção Fc da imunoglobulina G, já foram associados ao desenvolvimento do LES, porém o exato mecanismo de sua patogênese ainda não está bem esclarecido (Guerra, 2012).

Outras proteínas relevantes no processo de autoimunidade que estão relacionadas com a apoptose são as pentraxinas, moléculas que participam da resposta imune inata e modulam a ativação do sistema complemento restringindo o potencial inflamatório e imunogênico dos detritos celulares, entretanto seu exato mecanismo de ação é elusivo (Manfredi, 2008). A proteína C reativa (CRP) e o componente amilóide P do soro (SAP) são pequenas pentraxinas produzidas pelo fígado em resposta à IL-6 (interleucina 6) (Munoz, 2010). Nos tecidos periféricos, PTX3 (pentraxina longa 3) é induzida em resposta a citocinas e ativação de TLRs (Garlanda, 2005). CRP, SAP e PTX3 são proteínas de fase aguda e ligam-se aos detritos celulares remanescentes da apoptose (Manfredi, 2008). Níveis reduzidos destas proteínas, principalmente a CRP foram descritos em pacientes com LES e a dosagem de anticorpos contra CRP e SAP foi correlacionada com escores de atividade da doença (Kravitz, 2006).

### **1.5.2. Defeitos no sistema do complemento**

O sistema complemento é uma das primeiras linhas de defesa do sistema imune inato e possui três principais atividades: defesa do organismo contra infecções, integração entre o sistema imune inato e adaptativo e eliminação de imunocomplexos e detritos celulares (Walport, 2001; Zipfel, 2009; Ricklin, 2010). Ele atua através de três principais vias: a via clássica, a via da lectina e a via alternativa (Ricklin, 2010). De forma geral, estas vias culminam na formação de C5 e/ou C3 convertase que geram os produtos C5a, C5b, C3a e C3b. C3b promove a opsonização de bactérias enquanto C3a é uma anafilotoxina que promove a quimiotaxia de mastócitos e a contração de células da musculatura lisa (Rawal, 2008). C5a é uma importante anafilotoxina que promove a quimiotaxia e ativação de neutrófilos e fagócitos e C5b inicia a formação do complexo citolítico que causa a lise de bactérias e patógenos (Rawal, 2008).

A via clássica é ativada principalmente por aglomerados de anticorpos IgM ou IgG como, por exemplo, os imunocomplexos, mas também pode ser ativada por microorganismos ou por células apoptóticas que não foram corretamente eliminadas. A ligação de antígenos à porção Fab dos anticorpos altera a conformação da região Fc, permitindo a ligação de C1q que desencadeia a ativação da via clássica (Kravitz, 2006). C1q também pode desencadear a ativação da via clássica ao se ligar a outras proteínas como SAP, CRP e lactoferrina, e ao se ligar a alguns tipos de vírus, células ou poliânions (Kishore, 2000). Deficiências na via clássica do sistema complemento são fortes fatores de susceptibilidade para o desenvolvimento de LES, sendo que a maior associação está relacionada à deficiência do componente C1q (Gullstrand, 2009). Deficiências nos componentes C2 e C4, que também participam da via clássica, também já foram associadas ao desenvolvimento de LES (Truedsson, 2007).

A via da lectina é semelhante à via clássica, porém são as lectinas ligadoras de manose (MBLs) e ficolinas que reconhecem predominantemente padrões de carboidratos e iniciam esta via (Ricklin, 2010). As MBLs se associam a serinoproteases formando serinoproteases associadas a MBL (MASPs) que dão sequência à via das lectinas. Diversos estudos relatam associação entre polimorfismos no gene da MBL-2 e o desenvolvimento de LES (Sandrin-Garcia; Monticielo, 2008; Glesse, 2010; Monticielo, 2010; Panda, 2013; Xu, 2013).

A via alternativa é iniciada através da hidrólise de C3 em C3H<sub>2</sub>O que vai gerar uma C3 convertase culminando na formação dos produtos C3a, C3b e C5 convertase (Ricklin, 2010) previamente citados. Estudos sugerem que a ativação da via alternativa do complemento é um mecanismo importante na lesão tecidual na nefrite lúpica (Nowling, 2011).

### **1.5.3. Desregulação de linfócitos T**

Os linfócitos T são fundamentais na patogênese do LES, pois regulam as respostas dos linfócitos B e infiltram-se nos tecidos, gerando dano tecidual (Moulton, 2011). Os linfócitos T são extremamente importantes na imunidade celular. Existem diversos subtipos de linfócitos T que possuem funções

fundamentais no sistema imune, e alterações nestas funções podem levar ao surgimento ou agravamento do LES.

Os receptores de linfócitos T (TCRs) são os principais receptores destes linfócitos. As cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do TCR são acopladas às cadeias  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ , e  $\zeta$  da molécula CD3 formando o complexo do TCR. Este complexo é responsável pelo reconhecimento de antígenos acoplados ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) que são apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs). Alterações nestes complexos podem levar à hiperestimulação de linfócitos T, processo importante na patogênese do LES.

“Rafts” lipídicos (também conhecidos sob a tradução de jangadas ou balsas lipídicas) são microdomínios presentes na membrana celular, ricos em colesterol, que transportam complexos TCR-CD3 e moléculas de sinalização associadas (Moulton, 2011). Em linfócitos T normais, a estimulação do TCR leva à agregação destes “rafts” para ajudar na sinapse imunológica, permitindo interações com as células apresentadoras de antígenos (Moulton, 2011). Em pacientes com LES foi observado que os rafts se apresentavam pré-agregados, facilitando a ativação da célula e também tinham sua composição de moléculas alterada (Moulton, 2011).

CD44 é uma molécula de adesão presente na membrana dos linfócitos T que permite sua migração para os tecidos periféricos (Moulton, 2011). Células T de pacientes com LES apresentam grandes quantidades das isoformas v3 e v6 de CD44 que se correlacionam com a atividade da doença nestes pacientes (Crispin, 2010). Os linfócitos T ativados expressam o ligante de CD40 (CD40L ou CD154) que atua no auxílio aos linfócitos B que expressam a molécula CD40 através da ligação CD40-CD40L (Moulton, 2011). Os linfócitos T de pacientes com LES apresentam, após ativação, expressão aumentada e prolongada de CD40L (Koshy, 1996). Reciprocamente, os linfócitos B pré-ativados podem estimular os linfócitos T, o que aumenta a expressão de CD40L (Moulton, 2011). Os linfócitos T desregulados interagem com os linfócitos B, levando estes a produzir autoanticorpos (Moulton, 2011). Além disso, em linfócitos T de pacientes com LES também foram descritas alterações na expressão ou funcionamento de moléculas de vias de sinalização intermediárias, como a via da Proteína Quinase Ativada por



Mitógeno (MAPK) e do *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR), e em outras moléculas coestimulatórias como a Molécula de ativação de sinalização de linfócitos e o Coestimulador Induzível de Linfócitos T (Moulton, 2011).

Os linfócitos T de pacientes com LES produzem baixas quantidades da citocina pró-inflamatória IL-2 e também produzem pouca resposta em relação a esta citocina. (Alcocer-Varela, 1982). Embora esta relação pareça contraditória, a IL-2 é indispensável para o funcionamento de células T regulatórias que são fundamentais na manutenção da tolerância imunológica e no controle de respostas imunológicas aberrantes ou excessivas (Setoguchi, 2005). Além da IL-2, níveis elevados das citocinas pró-inflamatórias IL-17 e IL-23, que são secretadas por linfócitos T auxiliares, foram encontrados em pacientes com LES e relacionados à gravidade da doença (Wong, 2008).

Um desequilíbrio entre os subtipos dos linfócitos T auxiliares (Th1, Th2 e Th17) e T regulatórios parece estar envolvido na patogênese do LES, pois um direcionamento para uma resposta Th17 foi observado em pacientes com LES (Dolff, 2011). As principais citocinas secretadas pelos linfócitos Th1, Th2 e Th17 são interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-4 e IL-17, respectivamente.

#### **1.5.4. Hiperreatividade de linfócitos B**

Linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos e, conseqüentemente, são células fundamentais na patogênese de doenças autoimunes. Historicamente, o interesse da pesquisa em linfócitos B no LES era focado na produção de autoanticorpos, entretanto, além de serem responsáveis pela produção de autoanticorpos, os linfócitos B possuem outras funções, como apresentação de antígenos, ativação e coestimulação de linfócitos T, produção de citocinas e imunorregulação (Jacob, 2010). Estas características tornam os linfócitos B importantes alvos terapêuticos no LES (Jacob, 2010).

Dentre os diversos autoanticorpos presentes no LES, muitos têm importância clínica substancial. Por exemplo, anticorpos anti-DNA de dupla fita (anti-dsDNA) e anti-Sm são altamente específicos no LES, sendo pertinentes marcadores diagnósticos. Além disto, anti-dsDNA também são importantes marcadores de nefrite lúpica (Bastian, 2002; Jacob, 2010). Anticorpos anti-

proteína P ribossomal tem correlação com doença neuropsiquiátrica, anticorpos anti-cardiolipina são relacionados com aumento no risco para trombose intravascular, anticorpos anti-Ro (SS-A) em mães são correlacionados com bloqueio cardíaco congênito em recém-nascidos e anticorpos anti-ribonucleoproteínas (anti-RNP) são característicos de doença mista do tecido conjuntivo (Jacob, 2010).

Evidências recentes têm demonstrado que o LES pode se desenvolver independente da presença de autoanticorpos, porém a doença não se desenvolve na ausência de linfócitos B, ressaltando a importância destas células na patogênese da doença (Jacob, 2010). Em pacientes com LES, linfócitos B podem processar autoantígenos e apresentá-los para linfócitos T, iniciando uma resposta autoimune (Mamula, 1994). Linfócitos B altamente autorreativos se acumulam em pacientes com LES e em modelos murinos (Jacob, 2010).

Os linfócitos B podem coestimular linfócitos T através de diversas moléculas coestimulatórias. A coestimulação CD40-CD40L é muito importante no LES. O bloqueio ou a deficiência da coestimulação CD40-CD40L em modelos murinos reduziu a produção de anticorpos anti-dsDNA (Jacob, 2010). Além disso, no estudo conduzido por Kato e colaboradores, pacientes com LES apresentaram níveis elevados de CD40L solúvel no plasma e estes níveis estavam correlacionados aos títulos de anticorpos anti-dsDNA e à atividade da doença, indicando que o CD40L solúvel pode mediar a ativação dos linfócitos B (Kato, 1999). Em dois estudos em pacientes com nefrite lúpica tratados com anticorpos monoclonais contra CD40L houve redução dos níveis de anticorpos anti-dsDNA (Huang, 2002; Boumpas, 2003).

Além das funções de produção de anticorpos, apresentação de antígenos e coestimulação de linfócitos T, os linfócitos B também contribuem para a resposta imunológica através da produção de citocinas (Jacob, 2010). Quando os linfócitos B são estimulados serialmente através do receptor de linfócito B e da molécula CD40, há indução da produção de IL-6, TNF $\alpha$  e de linfotoxinas, uma combinação capaz de amplificar as respostas dos linfócitos B e T (Duddy, 2004). Entretanto, quando há apenas a estimulação não apropriada de CD40, a célula falha em

produzir citocinas pró-inflamatórias e passa a secretar IL-10, suprimindo a resposta imunológica (Duddy, 2004).

A associação entre o TNF $\alpha$  e o LES ainda é controversa, entretanto estudos recentes reforçam o papel de polimorfismos no gene do TNF $\alpha$  no desenvolvimento de LES (Dourmishev; Lee e Song). Tanto o TNF $\alpha$ , o IFN $\alpha$  e a IL-6 produzidos pelos linfócitos B são especialmente importantes no dano terminal de órgãos, como, por exemplo, os rins (Jacob, 2010). Além disso, estudos em humanos e modelos animais estabeleceram claramente o IFN $\alpha$  como um gatilho para o LES (Koutouzov, 2006).

### **1.5.5. Quimiocinas e seu envolvimento no LES**

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas diferencialmente expressas em tecidos inflamados ou linfóides, que atraem as células do sistema imunológico como linfócitos T e B, células dendríticas, granulócitos e monócitos através de receptores de quimiocinas diferencialmente expressos na membrana destas células (Sallusto, 2000). Duas características marcantes das quimiocinas são a redundância e a promiscuidade, ou seja, em geral: a) nenhuma quimiocina é exclusiva para uma única população de leucócitos, b) uma determinada população de leucócitos possui receptores para diferentes quimiocinas; c) uma mesma quimiocina pode se ligar a mais de um tipo de receptor; e d) diferentes quimiocinas podem se ligar a um mesmo receptor (Colobran, 2007).

Estudos recentes têm demonstrado a importância de quimiocinas e seus receptores na regulação da migração de leucócitos para órgão específicos e na inflamação, o que sugere a importância destas moléculas na patogênese de doenças autoimunes, inclusive no LES (Katschke, 2001; Lit, 2006; Schiffer, 2009; Wong, 2010; Yu, 2012). As principais quimiocinas descritas por seu envolvimento na patogênese do LES são: CXCL13, MCP-1 (proteína quimioatática de monócitos 1, também conhecida como CCL2) e CCL5 ou RANTES (regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais).

A quimiocina CXCL13 é um dos principais reguladores da migração de linfócitos B e seu envolvimento na patogênese do LES já foi demonstrado em estudos com humanos e modelos animais, sendo principalmente correlacionada

com a atividade da doença (Schiffer, 2009; Wong, 2010). Além de CXCL13, outras quimiocinas da família CXC também foram relacionadas com o LES como a CXCL1, CXCL9, CXCL8 e CXCL10 (Yu, 2012).

A quimiocina MCP-1 atrai monócitos, linfócitos T, células NK (“Natural Killer”) e basófilos (Loetscher, 1994). Estudos em pacientes com LES indicam que alterações nos níveis de MCP-1 estão associados com a atividade da doença e com a produção de beta-quimiocinas, e que o polimorfismo MCP-1-2518 está moderadamente associado com a susceptibilidade genética ao LES (Kaneko, 1999; Lit, 2006; Lima, 2007).

Outra importante quimiocina citada em diversos estudos por estar potencialmente envolvida na patogênese do LES é CCL5. Níveis plasmáticos elevados de CCL5 foram observados em pelo menos quatro estudos realizados em pacientes com LES (Eriksson, 2003; Lit, 2006; Vila, 2007; Lu, 2012). Um estudo recente conduzido por Zhao e colaboradores observou que um nível baixo da expressão do microRNA-125a, um regulador negativo de CCL5, contribui para uma maior expressão de CCL5 em pacientes com LES (Zhao, 2010). Além disto, esta quimiocina também foi correlacionada com nefrite lúpica em diversos estudos (Chan, 2006; Lit, 2006; Stasikowska, 2007; Tian, 2007; Xie, 2011).

## **1.6. Receptores de quimiocinas**

As quimiocinas exercem seu efeito biológico através da ligação a receptores de superfície celular, os receptores de quimiocinas. Estes receptores pertencem à família da rodopsina de receptores de superfície celular com sete domínios transmembrana acoplados à proteína G e sua principal função é o tráfego de linfócitos e os processos dependentes desta movimentação, que são a vigilância imunológica, as respostas inatas e adaptativas e a inflamação (Springer, 1994; Murphy, 2000). Cada receptor de quimiocinas parece ter um papel específico, determinado por seu padrão de expressão em subtipos específicos de leucócitos e pela especificidade temporal e espacial da expressão de seus ligantes (Murphy, 2000).

A nomenclatura dos receptores de quimiocinas é baseada na subclassificação das famílias de quimiocinas. Embora os receptores reconheçam mais de uma quimiocina, eles são normalmente restritos a uma subclasse, portanto, a nomenclatura dos receptores de quimiocinas é baseada na subclasse de quimiocinas pela qual o receptor tem especificidade (Murphy, 2000). As quimiocinas são subclassificadas por sua estrutura, de acordo com o número de cisteínas conservadas, nos quatro grupos principais CXC, CC, C e CX3C, nos quais a nomenclatura sistemática é baseada (Murphy, 2000). Para os receptores de quimiocinas, em geral, esta mesma nomenclatura é usada, acrescida de um “R” no final e um número.

Estudos sugerem que diferentes receptores de quimiocinas estejam envolvidos na patogênese do LES. O estudo realizado por Eriksson e colaboradores relatou diversas alterações na expressão dos receptores de quimiocinas em linfócitos T de pacientes com LES (Eriksson, 2003). Neste estudo foi observada uma redução na expressão dos receptores CCR6 em pacientes e uma redução na expressão de CXCR5 em pacientes com a doença ativa. Além disso, foi observado um aumento na expressão de CXCR2 e CCR1 em pacientes com a doença ativa, um aumento na expressão das quimiocinas MIP-1 $\beta$ , MCP-1, SDF-1a, IP-10 e CCL5 em pacientes e um aumento na expressão de CXCR3 e CCR3 em pacientes com envolvimento renal.

Em outro estudo realizado por Li e colaboradores, os níveis de expressão de mRNAs (RNAs mensageiros) de receptores de quimiocinas foram avaliados em pacientes com LES (Li, 2010). Neste estudo, foram observados níveis elevados do mRNA do CCR5 e do CX3CR1 em pacientes com LES, sendo que os níveis de expressão do mRNA do CX3CR1 foram maiores em pacientes com a doença ativa, menores em pacientes com a doença inativa, decrescendo ainda mais em controles. Também foram observados níveis elevados de mRNAs dos receptores CCR2, CCR3, CCR4, CCR6, CX3CR1, CXCR5, XCR1, e IL-4R em pacientes com a doença ativa quando comparados com pacientes com a doença inativa.

Diversos outros estudos relatam alterações nos níveis de expressão de receptores de quimiocinas em pacientes com LES e em modelos animais (Lee,

Shiao; Lu; Hase, 2001; Amoura, 2003; Perez de Lema, 2005; Enghard, 2009; Steinmetz, 2009; Wang, 2009; Wang, 2010), indicando um possível papel destes receptores na patogênese da doença.

Um processo importante para a atividade de certos receptores de quimiocinas consiste na sua capacidade de homo e heterodimerização. Este processo pode ser desencadeado pela ligação de quimiocinas a seus receptores (Rodriguez-Frade, 2001) ou pode ser constitutivo (Salanga, 2009) e evidências indicam que ele ocorre principalmente com os receptores CXCR1, CXCR2, CXCR4, CCR2, CCR5 e DARC (Salanga, 2009). É evidente que estes processos são relevantes para a fisiologia celular e na patogênese de doenças, entretanto ainda existem muitas dúvidas a serem esclarecidas em relação a estas interações (Salanga, 2009).

O presente trabalho tem como enfoque principal os receptores de quimiocinas do tipo CC, especificamente o CCR2 e o CCR5. O gene dos receptores de quimiocinas do tipo CC, CCR1 a CCR5, localizam-se em um *cluster* dentro do cromossomo 3 na região 3p21.3-p24 (Samson, Soularue, 1996). Na figura 1, modificada de Mangano e colaboradores, podemos observar a localização destes genes no cromossomo 3 (Figura 1B) e possíveis haplótipos formados na região promotora do *CCR5* (Figura 1A) (Mummidi, 2000; Mangano, 2001).

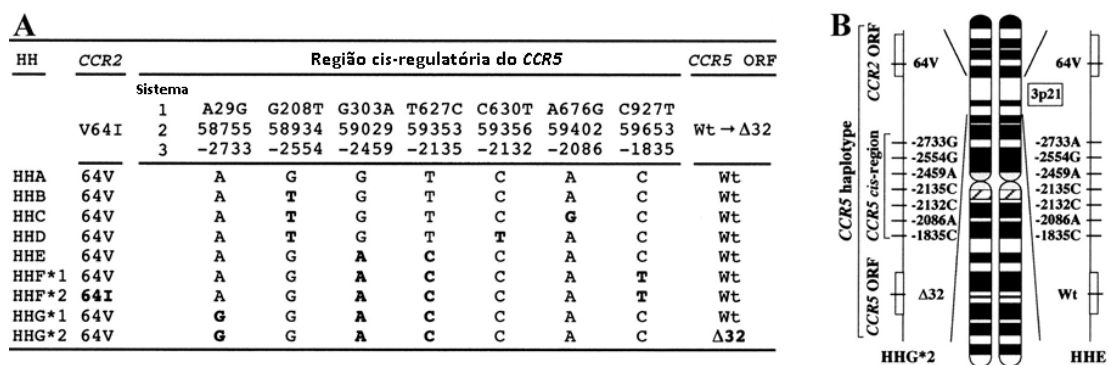


Figura 1: Ilustração esquemática dos haplótipos do *CCR5*. Na figura 1A: diferentes haplótipos do *CCR5* que incluem a ORF do *CCR2*. Neste trabalho a nomenclatura dos polimorfismos será abordada de acordo com o sistema 2 presente na figura. Figura 1B:

representação do cromossomo 3, evidenciando dois exemplos de haplótipos na região 3p21. Modificado de (Mangano, 2001).

### **1.6.1. CCR2**

O receptor de quimiocinas CCR2 foi descrito em 1994 por Yamagami e colaboradores (Yamagami, 1994). O CCR2 é expresso em monócitos, macrófagos, células dendríticas derivadas do sangue, células NK, basófilos, linfócitos T e B e pode se ligar às quimiocinas MCP-1, 2, 3 e 4, sendo altamente específico para MCP-1 (Myers, 1995; Frade, 1997). Este receptor possui duas isoformas, CCR2A e CCR2B, geradas por “splicing” alternativo de um mesmo gene e que diferem na sua cauda C-terminal, sendo que CCR2B parece ser a isoforma mais comum (Charo, 1994; Wong, 1997; Murphy, 2000). Em linhagens celulares transfectadas estáveis CCR2B parece ser bem transportado para a superfície celular enquanto CCR2A foi encontrado predominantemente no citoplasma (Wong, 1997). Também em células transfectadas com o CCR2, a sinalização do receptor se manifestou como mobilização intracelular de cálcio e inibição da adenilil ciclase culminando na quimiotaxia de leucócitos (Myers, 1995).

Polimorfismos no gene do CCR2 foram associados com diversas doenças (Navratilova, 2006). Um importante polimorfismo no gene do CCR2 é o CCR264I, formado por uma mutação de troca de sentido na qual a substituição de uma guanina por uma adenina leva à substituição na proteína de uma valina na posição 64 por uma isoleucina (Smith, 1997). Em um estudo realizado por Nakayama e colaboradores, foi observado que a expressão de CCR2A-64I foi significativamente maior do que a expressão do CCR2A sem a mutação enquanto os níveis de expressão não se alteraram com a presença do polimorfismo em CCR2B (Nakayama, 2004). Além disso, CCR2A-64I liga-se ao receptor CCR5, gerando a coprecipitação destas proteínas e redução na expressão de CCR5 na superfície celular (Nakayama, 2004). A frequência do polimorfismo CCR2-64I varia entre populações de diferentes origens étnicas, sendo de aproximadamente 13,2% na Europa e 17,2% na África (Martinson, 2000). No Brasil, a frequência do polimorfismo fica em torno de 11% em afro-descendentes (Vargas, 2005).

Além do estudo conduzido por Li e colaboradores, citado anteriormente, que relata níveis elevados do mRNA do CCR2 em pacientes com a doença ativa

quando comparados com pacientes com a doença inativa, outros estudos relatam um possível envolvimento deste receptor de quimiocinas na patogênese do LES. No estudo conduzido por Amoura e colaboradores, níveis reduzidos de linfócitos TCD4+ e CD8+, CCR2+ e TCD4+,CXCR3+ foram observados na circulação de pacientes com doença ativa (Amoura, 2003). Em outro estudo, conduzido por Malafonte e colaboradores, foi observada uma associação do alelo V (alelo selvagem do CCR2), com doença renal menos agressiva e uma associação do polimorfismo MCP-1-2518 com nefrite lúpica (Malafonte). No entanto, no estudo conduzido por Aguilar e colaboradores, nenhuma associação foi encontrada entre os polimorfismos CCR2-64I e CCR5delta32 e susceptibilidade à doença e nem entre o polimorfismo CCR2-64I e manifestações clínicas (incluindo nefrite) (Aguilar, 2003). Em modelos animais, dois estudos realizados em murinos relatam associação entre a presença do CCR2 e dano renal (Perez de Lema, 2001; Perez de Lema, 2005). Estes resultados indicam a necessidade de mais estudos relacionados ao receptor de quimiocinas CCR2 em pacientes com LES.

### **1.6.2. CCR5**

O CCR5 humano foi descrito em 1996 primeiramente por Samson e colaboradores (Samson, Labbe, 1996), e em seguida por dois outros grupos independentes (Combadiere, 1996; Raport, 1996). Neste mesmo ano, o CCR5 foi descrito por diferentes grupos como cofator para a entrada do HIV-1(vírus da imunodeficiência humana-1) nos linfócitos T (Alkhatib, 1996; Choe, 1996; Deng, 1996; Doranz, 1996; Dragic, 1996) e desde então, surgiram diversos estudos sobre este receptor. O CCR5 é um importante receptor de quimiocinas expresso em macrófagos, monócitos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos T e B e seus principais ligantes são MIP1 $\beta$ , MIP1 $\alpha$  e CCL5 (Combadiere, 1996; Raport, 1996; Samson, Labbe, 1996; Murphy, 2000).

O gene do CCR5 foi descrito em 1997 por Mummidi e colaboradores (Mummidi, 1997). Este gene possui vários sítios de início de transcrição e seu produto passa por um complexo *splicing* alternativo, dando origem a vários transcritos que diferem na região 5' não traduzida. O gene é organizado em quatro éxons e dois introns, sendo que os éxons dois e três não são interrompidos



por íntrons, os éxons quatro e parte do éxon três são compartilhados por todas as isoformas e a fase aberta de leitura localiza-se no éxon quatro. O gene parece possuir dois promotores distintos, um a montante do éxon um e outro a jusante, que inclui a região “intrônica” entre os éxons um e três, que parece ter atividade constitutiva. O produto final do gene é um polipeptídeo de 355 aminoácidos (Murphy, 2000).

Diversos polimorfismos foram descritos no *locus* do *CCR5* (Mummidi, 1997; Mummidi, 2000). O polimorfismo mais conhecido do *CCR5* é o *CCR5delta32*, que consiste em uma deleção de 32 pares de base, a qual induz resistência à infecção pelo HIV-1 (Dean, 1996; Liu, 1996; Samson, Libert, 1996; Zimmerman, 1997). Esta deleção resulta em uma mudança da fase de leitura e gera proteínas truncadas que não chegam à superfície celular e nem são detectadas no citoplasma (Liu, 1996). A distribuição do polimorfismo *CCR5delta32* é bem variável entre populações de diferentes origens étnicas, sendo que as maiores frequências são encontradas nas populações de origem europeia e as menores, encontradas em populações de origem africana e asiática (Martinson, 1997). A frequência do polimorfismo na Europa é de aproximadamente 6%, enquanto na África esta frequência é praticamente nula (Martinson, 2000). No Brasil, a frequência do polimorfismo varia de 3,8% a 9,3% em euro-descendentes e de 0,8% a 5,6% em afro-descendentes (Chies, 2003; Carvalho, 2004; Scheibel, 2008; Boldt, 2009).

A variação na região *cis* regulatória do *CCR5* é bem alta e, baseado nessa variação, haplótipos puderam ser organizados em sete haplogrupos humanos (HH) evolutivamente diferentes designados HHA, -B, -C, -D, -E, -F e -G (Mummidi, 2000), como podemos observar na Figura 1. Esta organização permite uma padronização da nomenclatura dos polimorfismos no *CCR5*, facilitando a interpretação dos estudos. A variante A do polimorfismo *CCR5-59029 G>A* (rs1799987), contido nos haplogrupos HHE, -F e -G, foi associada a maior eficiência transcricional do gene (McDermott, 1998; Mummidi, 2000).

Além da conhecida associação entre o *CCR5* e o HIV-1, este receptor de quimiocinas foi vastamente estudado em outras doenças e muitos destes estudos tiveram associações positivas como, por exemplo, nas doenças inflamatórias

artrite reumatóide (Gómez-Reino, 1999; Kohem, 2007), artrite idiopática juvenil (Scheibel, 2008), doença de Crohn (Herfarth, 2001), anemia falciforme (Chies, 2003), doença renal terminal (Borkar, 2011), asma (Al-Abdulhadi, 2010) e, inclusive, LES (Mamtani, 2008).

O papel do CCR5 no LES ainda é controverso, entretanto, apesar de alguns estudos não terem encontrado associação entre o CCR5 e a patogênese da doença, Mamtani e colaboradores demonstraram uma associação entre os haplótipos HHE e HHG\*2 e o risco de desenvolver LES e uma tendência de HHF\*1 em direção à proteção (Mamtani, 2008). Além disso, Aguilar e colaboradores sugeriram um leve aumento na produção de autoanticorpos, no desenvolvimento de nefrite e na gravidade da doença em portadores do CCR5delta32 (Aguilar, 2003). Em um estudo prévio de nosso grupo (Schauen JS *et al.* dados não-publicados), pacientes mulheres euro-descendentes apresentaram menor frequência do alelo CCR5delta32 quando comparados com controles e em afro-descendentes a presença do alelo foi associada à nefrite grave. Em relação à nefrite, um estudo em camundongos demonstrou que a deficiência de CCR5 agrava a glomerulonefrite através do recrutamento de linfócitos T pelo CCR1 (Turner, 2008). Em suma, o CCR5 parece ser um modificador no LES, porém estudos ainda são necessários para elucidar seu possível papel na patogênese desta doença.

Os resultados dos estudos publicados até hoje em relação ao envolvimento do CCR2 e do CCR5 na patogênese do LES são conflitantes. No entanto, eles indicam que estes receptores são relevantes no desenvolvimento da doença. Devido à importância dos receptores de quimiocinas na resposta imunológica e seu potencial papel na patogênese do LES, mais estudos são necessários para desvendar sua real função na patogênese da doença. Neste contexto, o presente estudo visa analisar polimorfismos nos genes dos receptores CCR2 e CCR5 e sua possível associação com o desenvolvimento e com as manifestações clínicas e laboratoriais do LES.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Tendo em vista a importância do receptor de quimiocinas CCR5 na resposta imune, este estudo tem por objetivo analisar potenciais implicações de variações nos genes dos receptores de quimiocinas CCR5 e CCR2 em pacientes com LES.

### **2.2. Objetivos específicos**

Investigar o possível papel dos polimorfismos CCR5-59353 C>T (rs1799988), CCR5-59356 C>T (rs41469351), CCR5-59402 A>G (rs1800023) e CCR5-59653 C>T (rs1800024), localizados na região promotora do gene CCR5, na susceptibilidade ao LES através da comparação das frequências genotípicas destas variantes em pacientes e controles.

Investigar o possível papel do polimorfismo CCR2-V64I G>A (rs1799864) na susceptibilidade ao LES através da comparação das frequências genotípicas destas variantes em pacientes e controles.

Realizar a análise dos haplótipos CCR2/CCR5.

Verificar uma possível associação dos polimorfismos com manifestações clínicas da doença.

### **3. ARTIGO CIENTÍFICO**

Artigo em fase de preparação para ser enviado à revista *Journal of Autoimmunity*.

## **CCR5 PROMOTER REGION POLYMORPHISMS IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS**

**Juliana da Silveira Schauen<sup>a</sup>, Camila Rosat Consiglio<sup>a</sup>, Odirlei André Monticielo<sup>b</sup>, Ricardo Machado Xavier<sup>b</sup>, João Carlos Tavares Brenol<sup>b</sup>, José Artur Bogo Chies<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Immunogenetics Laboratory, Genetics Department, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre – Brazil.

<sup>b</sup> Rheumatology Division, Internal Medicine Department, Hospital de Clinicas de Porto Alegre – HCPA/UFRGS, Porto Alegre - Brazil.

**Corresponding author:** José Artur Bogo Chies.

Immunogenetics Laboratory, Genetics Department, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre – Brazil.

Bairro Agronomia, Avenida Bento Gonçalves 9500, Prédio 43323, Laboratório 212.

CEP 91501-970 - Caixa Postal 15053

Phone: 55-51-33086737

Fax: 55-51-33087311

E-mail:jabchies@terra.com.br

## ABSTRACT

Given the lack of consensus considering the role of chemokine receptors in Systemic Lupus Erythematosus (SLE) pathogenesis and the need for more studies in this area, the present work aims to investigate a possible role of the *CCR5* promoter region polymorphisms in the development of SLE comparing the frequencies of the genotypes and haplotypes with ethnically matched controls and analyze if there is a possible involvement of the polymorphisms in the clinical outcome of the disease. This study included 382 SLE patients (289 classified as European-derived and 93 as African-derived) and 375 controls (243 European-derived and 132 African-derived) genotyped for the *CCR2*-64I G>A (rs1799864), *CCR5*-59353 C>T (rs1799988), *CCR5*-59356 C>T (rs41469351), *CCR5*-59402 A>G (rs1800023) and *CCR5*-59653 C>T (rs1800024) polymorphisms through PCR-RFLP and direct sequencing, respectively. Previous data from *CCR5*delta32 were included in the study to infer the haplotypes and also as a possible confounding factor in the binary logistic regression. Our results indicated that, in European-derived patients, *CCR5*delta32 and the HHG\*2 haplotype reduced frequencies in patients when compared to controls were associated with the disease ( $p=0.001$ ; OR 3.5; 95%CI 1.6-7.5 and 2.0%, vs. 7.2% residual  $p= 2.9E-5$ , respectively). In African-derived patients, the HHA/HHB, HHC and HHG\*2 haplotype frequencies differed between patients and controls (10% vs. 20.5%, residual  $p= 0.003$ ; 29.4% vs. 17.4%, residual  $p=0.003$  and 3.9% vs. 0.8%, residual  $p=0.023$ ; respectively). Considering the clinical manifestations of the disease, *CCR5*delta32 presence was confirmed as a susceptibility factor to class IV nephritis in the African-derived group and when patients were considered together ( $p_{corrected}=0.012$ ; OR 3.0; 95%CI 3.0-333.3 and  $p_{corrected}= 0.0006$ ; OR 6.8; 95%CI 1.9-2.48, respectively). In conclusion, this study indicates that *CCR5* promoter polymorphisms are important disease modifiers in SLE. Present data reinforces *CCR5*delta32 polymorphism as a protective factor for the development of the disease in European-derived patients and as a susceptibility factor for class IV nephritis in African-derived patients. Furthermore, we also describe a reduced frequency of HHA/HHB and an enhanced frequency of HHC and HHG\*2

haplotypes in our African-derived patients, which potentially could reflect in a higher expression of CCR5 in specific cell subsets and in a lower expression of CCR5 overall.

**Keywords:** CCR5, CCR5 promoter polymorphisms, CCR2, Lupus, Systemic Lupus Erythematosus.

## 1. INTRODUCTION

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory autoimmune disease characterized by abnormal activity of B and T cells [1, 2], autoantibodies production and immunocomplex deposition leading to tissue damage. The clinical manifestations of the disease include renal, hematological, immunological, neurological, cutaneous, cardiovascular and arthritis. The disease affects mainly women in reproductive age, in a frequency of around 9 women to 1 men. In Brazil, there are few data regarding the incidence of SLE. Available data indicate that incidence ranges from 4.8/100,000 inhabitants/ year [3] to 8.7/100,000 inhabitants/ year in the northeast [4]. The disease seems to be more frequent in African-derived individuals and less frequent in native Africans [5, 6].

The etiology of SLE is complex, nevertheless, genetic, immunological and environmental factors are known to participate in the etiology of the disease. Many factors are known to participate in the pathogenesis of SLE, for instance, defects on apoptosis, alterations on the complement system and abnormal function of T and B cells, including alterations in the cytokines or chemokines balance [2, 7-14]. Chemokines and their receptors are central players in the regulation of leucocytes chemotaxis in inflammation and they are thought to have an important role in the pathogenesis of autoimmune diseases, including SLE [15-17].

Several studies have addressed the role of chemokines and their receptors in SLE, however there is no consensus regarding their involvement on the pathogenesis of the disease. The chemokine receptors CCR2 and CCR5 and some of their ligands MCP-1, MIP-1 $\beta$  and CCL5 have already been suggested to have a role in SLE pathogenesis [13, 15, 17-20]. CCR2 and CCR5 are important chemokine receptors of the CC chemokines family localized in a cluster on chromosome 3 in the 3p21.3-p24 region [21]. CCR2 is expressed on monocytes, macrophages, blood derived dendritic cells, T and B cells, Natural Killer cells and basophils, and its main ligands are MCP-1, 2, 3 and 4, with high specificity for MCP-1 [22, 23]. CCR5 is expressed on monocytes, macrophages and dendritic, T and B cells, and its main ligands are MIP1 $\beta$ , MIP1 $\alpha$  and CCL5 [24-27].



CCR5 role in SLE pathogenesis is still controversial, however, despite the lack of association of this receptor with SLE pathogenesis in some studies, Mamtani *et al.* described an important association of the CCR5 promoter region human haplotypes (HH) HHE and HHG\*2 with a risk of developing SLE and a tendency of the HHF\*1 towards protection [17]. Furthermore, Aguilar *et al.* suggested a slight increase in the production of autoantibodies, in nephritis development and in disease severity in patients bearing the CCR5delta32 allele [28]. Moreover, according to a previous work of our group (Schauren JS *et al.*, unpublished data), SLE European-derived women presented a lower frequency of the CCR5delta32 allele when compared to ethnically matched controls and the presence of the allele was associated to severe nephritis in African-derived patients.

Given the lack of consensus considering the role of chemokine receptors in SLE pathogenesis and the need for more studies in this area, the present work aims to investigate a possible role of the CCR5 promoter region polymorphisms in the development of SLE comparing the frequencies of the genotypes and haplotypes with ethnically matched controls and analyze if there is a possible involvement of the polymorphisms in the clinical outcome of the disease.

## **2. METHODS**

### **2.1. Study populations**

Patients group included 382 individuals (289 classified as European-derived and 93 as African-derived) and was provided by the Rheumatology Clinic of the “Hospital de Clínicas de Porto Alegre”(HCPA). Control group included 375 healthy blood donors (243 European-derived and 132 African-derived), of these, 301 from Rio Grande do Sul (RS) and 74 from Rio de Janeiro (RJ). Both patients and controls were recruited by convenience sampling. Ethnical classification was based on the physical appearance as judged by the researcher at the time of blood collection and on data about the ethnicity of parents/grandparents reported by the participants. The self-reported “color” classification frequently used in Brazil is well documented in different studies [29-31], including previous studies of our

group [32, 33]. It is noteworthy that, in Southern Brazilian populations from the same region addressed in this study, the individuals classified as White have a mean European ancestry of 85.5% and ~1% of African ancestry, while individuals classified as Brown and Black, have approximately 45% of African, 44% of European and 11% of Amerindian ancestry [29]. This study also revealed that the genomic ancestry of individuals from different geographical region of Brazil is more uniform than expected.

SLE patients were diagnosed according to the revised American College of Rheumatology criteria [34, 35]. The clinical and laboratory variables assessed in this study were: photosensitivity, malar rash, discoid rash, oral or nasal ulcers, arthritis, serositis -pleuritis or pericarditis-, nephritis and neurological disease - seizures or psychosis. The laboratory evaluation included the presence of hematological disorders -hemolytic anemia, leukopenia, lymphopenia or thrombocytopenia-, immunological disorders and positive antinuclear antibody (ANA). SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) [36] and SLICC (Systemic Lupus International Collaborating Clinics) damage index [37] were applied to each patient as a measurement of disease activity and cumulative damage, respectively. Lupus nephritis classification was performed according to the World Health Organization (WHO) classification from 1982, revised in 2003 [38] and renal biopsy recommendation criteria were persistent protein excretion greater than 500 mg/day and/or an active urinary sediment with hematuria, typically dysmorphic, and cellular casts [39]. Class IV nephritis was included in the analyses of clinical manifestations, as our previous work indicates that CCR5delta32 African-derived carriers presented a higher predisposition to this class of nephritis.

The present study was approved by the ethic committee from the HCPA/UFRGS and informed consent was obtained from all subjects.

## **2.2. PCR and Genotyping**

DNA samples were extracted by salting out method [Lahiri, 1991 #1191] and stored at -20°.

The *CCR5* promoter region polymorphisms CCR5-59353 C>T (rs1799988), CCR5-59356 C>T (rs41469351), CCR5-59402 A>G (rs1800023) and CCR5-59653 C>T (rs1800024) were amplified in each sample by Polymerase Chain Reaction (PCR) using the primers LK84 and LK87 previously described [40, 41]. Amplification was performed in a final volume of 30 µl containing 5 mM each of dNTP; 37.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 pmol/µl of each primer; 1 unit of Platinum Taq DNA Polymerase in 10X PCR-specific buffer (Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, Brazil) and 10 to 100 ng of genomic DNA. The initial denaturation cycle was carried out at 94°C for 5 minutes; followed by 35 cycles at 95°C for 30s; 60°C for 30 s; 72°C for 1 minute and by a final extension step at 72°C for 5 minutes. The amplification product was quantified (10 to 50 ng/µl) by Low Mass (Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, Brazil) in 1% agarose gel. Each PCR product was purified and sequenced using LK84 primer in an ABI 3730 XL DNA Sequencer according to the manufacturer's manual by Macrogen Korea (Macrogen Inc.). Genotyping was performed by interpretation of chromatogram peaks through FinchTV Software Version 1.4.0.

The CCR2-64I G>A (rs1799864) polymorphism was genotyped through PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) assay using *Bsa*BI restriction endonuclease as defined by Smith *et al.* [42] and the assay was performed as described by Vargas *et al.* [43].

### **2.3. Statistical analysis**

Due to the lack of some clinical and/or laboratory data in the medical records, some analyses may not include all the individuals genotyped in this work. The genotypic frequencies of the polymorphisms in the promoter region of the *CCR5*, including CCR2, were compared with Hardy-Weinberg expectations using chi-square tests. Comparisons of the polymorphisms frequencies by ethnicity in control and patient groups were performed using Binary Logistic Regression controlling for gender. For susceptibility analyses, we considered the presence or absence of the polymorphic variant designated as carriers and non-carriers,

respectively. These frequencies were compared between patients and controls, between control groups from RS and RJ and between patients with or without a given clinical or laboratory feature using Binary Logistic Regression controlling for possible confounding factors. Ranks for SLICC and SLEDAI were analysed by Mann-Whitney tests. Statistical analyses were performed using the softwares SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) and WinPepi [44].

Haplotypes were estimated by Mlocus software and included the polymorphisms CCR2-64I, CCR5-59353, CCR5-59356, CCR5-59402, CCR5-59653 and CCR5delta32 (whose genotypes were previously obtained by our group - Schuren JS *et al.*, unpublished data). Haplotype frequencies were compared between patients and controls in European and African-derived groups by chi-square tests.

Significance level was established as  $\alpha=0.05$  (two-tailed) and Bonferroni correction for multiple comparisons was applied when the *p* value was significant.

### **3. RESULTS**

#### **3.1. Patients and controls**

Due to the known differences in the disease incidence [5] and in the *CCR5* promoter region genotypic frequencies [45] among different ethnicities, in this study, analyses were stratified or controlled by the most frequent ethnicities in our population, European and African ancestry.

Patients group comprised 350 women and 32 men. The average age of patients was  $45.4 \pm 15.1$  years and mean age at diagnosis was  $32.6 \pm 13.9$  years. The median value for the SLEDAI accessed at the first evaluation was 1.0 (0 and 4.0 for percentiles 25 and 75, respectively) and the SLICC index was 1.0 (0 and 2.0). Other clinical characteristics are shown in Table 1. Comparisons between European-derived and African-derived patients concerning disease manifestations have already been addressed in this cohort by Monticielo *et al.* [46]. The comparisons indicated that European-derived group presented more photosensitivity and lower proportion of individuals presenting leukopenia/lymphopenia and the autoantibodies anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B

[46]. Furthermore, it was observed that male patients presented a higher frequency of nephritis than female patients, although the number of male patients in this group is relatively small.

Control group consisted of 90 women and 260 men and the mean age of controls was  $41.4 \pm 10.1$  years. All analyses involving control group were controlled by this factor. Comparing the genotypic frequencies of all polymorphism addressed in this study, controlling for gender and age, control groups from RS and RJ did not differ statistically, so we joined this groups and considered control group as one.

### **3.2. Genotypes**

Genotypic frequencies of the polymorphisms in patients and controls are presented in table 2. All groups were in Hardy-Weinberg equilibrium, exception made for CCR5-59653 frequencies in European-derived control group and in the whole group (data not shown). We observed that in the control group, the frequencies of the CCR5-59353, CCR5-59356 and CCR5-59402 polymorphisms were different between European and African-derived groups ( $p_{\text{corrected}}=0.018$ ,  $p_{\text{corrected}}=0.004$  and  $p_{\text{corrected}}<0.001$ , respectively). In SLE group, only the CCR5-59356 polymorphism frequency differed between European and African-derived groups ( $p_{\text{corrected}}=0.002$ ).

### **3.3. Susceptibility analyses**

As our previous work indicate CCR5delta32 (32 bp deletion which generates a truncated protein that does not reach the cell surface) as a protective factor to development of SLE, we included this polymorphism, ethnicity, gender and potential interactions as possible confounding factors in the binary logistic regression analyses. The final model included CCR2-64I, CCR5-59353, CCR5-59356, CCR5-59402, CCR5-59653 and CCR5delta32 polymorphisms, gender and ethnicity. In the analysis considering patient and control groups as a whole, the genotypic frequencies of the CCR2-64I, CCR5-59353, CCR5-59356, CCR5-59402 and CCR5-59653 did not differ between these groups while only female gender and the CCR5delta32 wild type homozygous (wt/wt) were associated with

the disease, as shown in table 3 ( $p < 0.001$ ; OR 25; 95%CI 15.8-39.4 and  $p = 0.010$ ; OR 2.5; 95%CI 1.2-5.0, respectively). When splitted by ethnicity, the analysis of European-derived groups also indicated female gender and CCR5delta32 wt/wt association with the disease ( $p < 0.001$ ; OR 22; 95%CI 13.3-36.4 and  $p = 0.001$ ; OR 3.5; 95%CI 1.6-7.5, respectively), meanwhile, in the African-derived group, only female gender was associated with the disease ( $p < 0.001$ ; OR 58.4; 95%CI 16.8-203.2) (table 3).

### 3.4. Clinical manifestations

The prevalence of the clinical and laboratory features of SLE patients was compared considering the presence or absence of each variant allele and controlling for confounding factors. Considering patient group as a whole and splitting the analysis by ethnicity, only the CCR5delta32 presence was confirmed as a susceptibility factor to class IV nephritis in the African-derived group and when patient group was considered as a whole ( $p_{\text{corrected}} = 0.012$ ; OR 3.0; 95%CI 3.0-333.3 and  $p_{\text{corrected}} = 0.0006$ ; OR 6.8; 95%CI 1.9-2.48, respectively). European-derived patients showed the same tendency, however, after correction, the analysis lost its significance. None of the clinical and laboratory features included in the analyses was significantly associated to any of the other polymorphic variants.

### 3.5. Haplotypes

Linkage disequilibrium (LD) between polymorphisms for patients and controls are presented in table 4. LD was considered significant when  $p < 0.05$  and Lewontin Normalized Coefficient  $D' = 1$ . None of the polymorphisms in LD presented complete LD ( $r^2 < 0.50$ ). All groups presented LD between the CCR5-59353 and CCR5-59356, which was expected due to the vicinity of these polymorphisms (3bp distance). Beyond the data presented in table 4, we observed that in the LD analyses between the CCR5-59353, CCR5-59356, CCR5-59402 and CCR5-59653 polymorphisms almost all combinations had a  $D' > 0.9$ .

A set of seven evolutionary distinct human haplotypes in the promoter region of the CCR5 gene have already been described, namely HHA, HHB, HHC,

HHD, HHE, HHF (F\*1, F\*2), and HHG (G\*1, G\*2) [47], and, as the frequencies of other haplotypes were very low, we joined rare haplotypes into two groups considering the presence or absence of the CCR5delta32 allele: rare bearing d32 and rare not bearing d32. Haplotype frequencies and comparisons between patients and controls in European and African-derived groups are presented in table 5. Comparisons between patients and controls haplotype frequencies showed that overall frequencies differed in both European and African-derived groups ( $p_{\text{corrected}} = 0.006$  and  $0.002$ , respectively). In European-derived group, only the HHG\*2 haplotype frequency was significantly higher in controls than in patients (7.2% vs. 2.0%, residual  $p = 2.9E-5$ ). In African-derived group, the HHA/HHB, HHC and HHG\*2 haplotype frequencies differed between patient and control groups (10% vs. 20.5%, residual  $p = 0.003$ ; 29.4% vs. 17.4%, residual  $p = 0.003$  and 3.9% vs. 0.8%, residual  $p = 0.023$ ; respectively).

#### 4. DISCUSSION

To date, no study has been carried out on the role of *CCR5* promoter polymorphisms in SLE patients from southern Brazil. This work corroborates our previous findings regarding the involvement of CCR5delta32 in protection to SLE in European-derived patients and in susceptibility to class IV nephritis in African-derived patients and in SLE patients as a whole. In the previous work, European-derived patients presented a lower frequency of the CCR5delta32 polymorphism (in other words, a higher frequency of homozygous for the wild type allele which promotes a normal production of this cell surface receptor) when compared to ethnically matched controls suggesting that the lack of CCR5 in the immune cells surface could be a protective factor against the disease (Schauen JS *et al.*, unpublished data).

In the present work, CCR5delta32 polymorphism was included in the logistic regression model and, even when controlled for gender and the *CCR5* promoter region polymorphisms, including CCR2-64I, it was the only polymorphism significantly associated with protection to the disease. Furthermore, HHG\*2 haplotype, bearing the CCR5delta32 allele, was the only haplotype

associated to SLE protection in European derived patients. These findings are interestingly opposed to the results found by Mamtani *et al.*, which indicated that the HHG\*2 haplotype was a risk factor for developing SLE [17], probably reflecting different genetic background constitution of the studied populations. Interestingly, a recent study performed in Germany indicated that CCR5+/CCR3+ T helper cell ratio was enhanced in patients with active Cutaneous Lupus Erythematosus [48], which is in accordance with our findings. Moreover, another German research demonstrated that the presence of the CCR5delta32 has a protective effect on the development of another autoimmune disease, Rheumatoid arthritis (RA) [49], which was also associated with a diminished expression of the CCR5-delta32 allele in European patients overall [50].

In the African-derived group analyses, the frequencies of the haplotypes HHA/HHB, HHC and HHG\*2 differed between patient and control groups. In this group, HHG\*2 haplotype frequency was slightly increased in patients when compared to controls, the opposite of European-derived patients and corroborating the findings of Mamtani *et al.*[17]. This finding is very interesting due to the fact that HHG\*2 bears the CCR5delta32 allele. This allele is not originally present in native African populations [51] and its presence in African-derived individuals results from miscegenation. None of the studies regarding CCR5delta32 involvement in SLE addressed African-derived patients [17, 28, 52]. Picton *et al.* described that CCR5 promoter haplotypes influence CCR5 expression in Natural Killer (NK) and in T cell subsets in South African populations [53]. They demonstrated that HHC+ haplotype increased the expression of CCR5 in NK cells (independent of the presence of CCR5delta32) and in T CD8+ cells (not independent of the presence of CCR5delta32) in South African Caucasian individuals and that HHA haplotype was associated with a diminished expression of CCR5 in T CD8+ cells. Bearing this in mind, we can infer that the diminished frequency of HHA and the enhanced frequency of HHC in our African-derived patients could be related to a higher expression of CCR5 in specific cell subsets and to a lower expression of CCR5 overall.

Regarding CCR2-64I polymorphism, no direct association with SLE was found, in accordance to the findings of Aguilar *et al.* [28]. Data available in the



literature is conflicting. The study conducted by Amoura *et al.* indicated that CD4+, CCR2+ T cells are decreased in French patients during lupus flares [54], however the study conducted by Li *et al.* indicates that CCR2 expression is higher in Chinese patients with active disease [16]. This same study also reported an increased CCR5 mRNA level in SLE patients compared to controls which was consistent to the findings of Al-Saleh *et al.* that reported a significantly elevated mean expression of CCR5 and CXCR3 on the surface of CD4+ T-lymphocytes of active SLE patients than in the SLE patients in remission and healthy controls [55].

Concerning clinical manifestations, only the CCR5delta32 was confirmed as a susceptibility factor to class IV nephritis as previously discussed (Schauren JS *et al.*, unpublished data), even when controlling for the presence of the CCR5 promoter region polymorphisms, including CC2-64I, gender and ethnic origin.

The apparent controversial role of CCR5 described by the present work is not a novelty in autoimmune diseases. This controversial role has been extensively debated in RA [50, 56, 57] and, in an overall assessment, it seems more likely that the reduced expression of CCR5 is protective against the development of RA. In the present work, SLE seems to follow the same tendency observed in RA. In a global appraisal, reduced expression of CCR5 seems to be protective against SLE development, however many points need to be discussed here. First, ethnic origin is an extremely important factor related to SLE and CCR5 expression and should receive special attention in data interpretation. Second, some of the studies mentioned here have small sample sizes, which can include a bias in their conclusions. Third the unclear role of CCR5 may be due to the presence of this receptor in cells with different functions in the immune system, for instance, T helper and T regulatory cells. CCR5 presence in the surface of immune system cells helps their migration to tissues, promoting inflammation. In the other hand, CCR5 can also be involved in resolution of inflammation through its presence in T regulatory cells or through its action as decoy receptor [58, 59].

In conclusion, this study indicates that CCR5 promoter polymorphisms are important disease modifiers in SLE and that genetic background should be carefully considered in studies regarding SLE and chemokine receptors. Present data reinforces CCR5delta32 polymorphism as a protective factor for the

development of the disease in European-derived patients and as a susceptibility factor for class IV nephritis in African-derived patients. Furthermore, we also describe a reduced frequency of HHA/HHB and an enhanced frequency of HHC and HHG\*2 in our African-derived patients, which could be related to a higher expression of CCR5 in specific cell subsets and to a lower expression of CCR5 overall. These findings are further evidence that CCR5 promoter polymorphisms are important in autoimmune diseases and emphasize the need for more studies in this area.

## REFERENCES

1. Dörner, T., Giesecke, C., Lipsky, P.E. 2011. Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE. *Arthritis research & therapy*, 13: 243.
2. Moulton, V.R., Tsokos, G.C. 2011. Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*, 13: 207.
3. Nakashima, C.A., Galhardo, A.P., Silva, J.F., Fiorenzano, G.R., Santos, A.B., Leite, M.F., Nogueira, M.A., Menolli, P.V., Menolli, R.A. 2011. Incidence and clinical-laboratory aspects of systemic lupus erythematosus in a Southern Brazilian city. *Rev Bras Reumatol*, 51: 231-9.
4. Vilar, M.J., Sato, E.I. 2002. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus*, 11: 528-32.
5. McCarty, D.J., Manzi, S., Medsger, T.A., Jr., Ramsey-Goldman, R., LaPorte, R.E., Kwok, C.K. 1995. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum*, 38: 1260-70.
6. Borchers, A.T., Naguwa, S.M., Shoenfeld, Y., Gershwin, M.E. 2010. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews*, 9: A277-87.
7. Munoz, L.E., Lauber, K., Schiller, M., Manfredi, A.A., Herrmann, M. 2010. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol*, 6: 280-9.
8. Shao, W.-H., Cohen, P.L. 2011. Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*, 13: 202.
9. Gullstrand, B., Martensson, U., Sturfelt, G., Bengtsson, A.A., Truedsson, L. 2009. Complement classical pathway components are all important in clearance of apoptotic and secondary necrotic cells. *Clin Exp Immunol*, 156: 303-11.
10. Truedsson, L., Bengtsson, A.A., Sturfelt, G. 2007. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 40: 560-6.
11. Jacob, N., Stohl, W. 2010. Autoantibody-dependent and autoantibody-independent roles for B cells in systemic lupus erythematosus: past, present, and future. *Autoimmunity*, 43: 84-97.
12. Wong, C.K., Lit, L.C., Tam, L.S., Li, E.K., Wong, P.T., Lam, C.W. 2008. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in autoimmunity. *Clin Immunol*, 127: 385-93.
13. Lit, L.C., Wong, C.K., Tam, L.S., Li, E.K., Lam, C.W. 2006. Raised plasma concentration and ex vivo production of inflammatory chemokines in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 65: 209-15.
14. Schiffer, L., Kumpers, P., Davalos-Misslitz, A.M., Haubitz, M., Haller, H., Anders, H.J., Witte, T., Schiffer, M. 2009. B-cell-attracting chemokine CXCL13 as a marker of disease activity and renal involvement in systemic lupus erythematosus (SLE). *Nephrol Dial Transplant*, 24: 3708-12.

15. Eriksson, C., Eneslatt, K., Ivanoff, J., Rantapaa-Dahlqvist, S., Sundqvist, K.G. 2003. Abnormal expression of chemokine receptors on T-cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 12: 766-74.
16. Li, Y.-m., Chen, Z.-q., Yao, X., Yang, A.-z., Li, A.-s., Liu, D.-m., Gong, J.-q. 2010. mRNA Expression of Chemokine Receptors on Peripheral Blood Mononuclear Cells and Correlation with Clinical Features in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Chinese Medical Sciences Journal*, 25: 162-168.
17. Mamtani, M., Rovin, B., Brey, R., Camargo, J.F., Kulkarni, H., Herrera, M., Correa, P., Holliday, S., Anaya, J.-M., Ahuja, S.K. 2008. CCL3L1 gene-containing segmental duplications and polymorphisms in CCR5 affect risk of systemic lupus erythematosis. *Annals of the rheumatic diseases*, 67: 1076-83.
18. Lu, M.M., Wang, J., Pan, H.F., Chen, G.M., Li, J., Cen, H., Feng, C.C., Ye, D.Q. 2012. Increased serum CCL5 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*, 32: 1231-3.
19. Kaneko, H., Ogasawara, H., Naito, T., Akimoto, H., Lee, S., Hishikawa, T., Sekigawa, I., Tokano, Y., Takasaki, Y., Hirose, S.I. *et al.* 1999. Circulating levels of beta-chemokines in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 26: 568-73.
20. Lima, G., Soto-Vega, E., Atisha-Fregoso, Y., Sanchez-Guerrero, J., Vallejo, M., Vargas-Alarcon, G., Llorente, L. 2007. MCP-1, CCL5, and SDF-1 polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol*, 68: 980-5.
21. Samson, M., Soularue, P., Vassart, G., Parmentier, M. 1996. The genes encoding the human CC-chemokine receptors CC-CKR1 to CC-CKR5 (CMKBR1-CMKBR5) are clustered in the p21.3-p24 region of chromosome 3. *Genomics*, 36: 522-6.
22. Myers, S.J., Wong, L.M., Charo, I.F. 1995. Signal transduction and ligand specificity of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor in transfected embryonic kidney cells. *J Biol Chem*, 270: 5786-92.
23. Frade, J.M., Mellado, M., del Real, G., Gutierrez-Ramos, J.C., Lind, P., Martinez, A.C. 1997. Characterization of the CCR2 chemokine receptor: functional CCR2 receptor expression in B cells. *J Immunol*, 159: 5576-84.
24. Combadiere, C., Ahuja, S.K., Tiffany, H.L., Murphy, P.M. 1996. Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and CCL5. *J Leukoc Biol*, 60: 147-52.
25. Raport, C.J., Gosling, J., Schweickart, V.L., Gray, P.W., Charo, I.F. 1996. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for CCL5, MIP-1beta, and MIP-1alpha. *J Biol Chem*, 271: 17161-6.
26. Samson, M., Labbe, O., Mollereau, C., Vassart, G., Parmentier, M. 1996. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry*, 35: 3362-7.
27. Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hébert, C.a., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., Power, C.a. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological reviews*, 52: 145-76.

28. Aguilar, F., Núñez-Roldán, A., Torres, B., Wichmann, I., Sánchez-Román, J., González-Escribano, M.F. 2003. Chemokine receptor CCR2/CCR5 polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*, 30: 1770-4.
29. Pena, S.D.J., Di Pietro, G., Fuchshuber-Moraes, M., Genro, J.P., Hutz, M.H., Kehdy, F.D.S.G., Kohlrausch, F., Magno, L.A.V., Montenegro, R.C., Moraes, M.O. *et al.* 2011. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS one*, 6: e17063.
30. Leite, T.K.M., Fonseca, R.M.C., de França, N.M., Parra, E.J., Pereira, R.W. 2011. Genomic ancestry, self-reported "color" and quantitative measures of skin pigmentation in Brazilian admixed siblings. *PLoS one*, 6: e27162.
31. Parra, F.C., Amado, R.C., Lambertucci, J.R., Rocha, J., Antunes, C.M., Pena, S.D. 2003. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 177-82.
32. Vargas, A.E., Marrero, A.R., Salzano, F.M., Bortolini, M.C., Alegre, P. 2006. Frequency of CCR5  $\Delta\Delta$  32 in Brazilian populations, 5: 321-325.
33. Veit, T.D., Cordero, E.a.a., Mucenic, T., Monticielo, O.a., Brenol, J.C.T., Xavier, R.M., Delgado-Cañedo, a., Chies, J.a.B. 2009. Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 18: 424-30.
34. Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F., Masi, A.T., McShane, D.J., Rothfield, N.F., Schaller, J.G., Talal, N., Winchester, R.J. 1982. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 25: 1271-7.
35. Hochberg, M.C. 1997. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 40: 1725.
36. Bombardier, C., Gladman, D.D., Urowitz, M.B., Caron, D., Chang, C.H. 1992. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum*, 35: 630-40.
37. Gladman, D., Ginzler, E., Goldsmith, C., Fortin, P., Liang, M., Urowitz, M., Bacon, P., Bombardieri, S., Hanly, J., Hay, E. *et al.* 1996. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 39: 363-9.
38. Weening, J.J. 2004. The Classification of Glomerulonephritis in Systemic Lupus Erythematosus Revisited. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15: 241-250.
39. Falk, M.J., Dugan, R.B., O'Riordan, M.A., Matthews, A.L., Robin, N.H. 2003. Medical Geneticists' duty to warn at-risk relatives for genetic disease. *American journal of medical genetics. Part A*, 120A: 374-80.
40. Kostrikis, L.G., Neumann, a.U., Thomson, B., Korber, B.T., McHardy, P., Karanickolas, R., Deutsch, L., Huang, Y., Lew, J.F., McIntosh, K. *et al.* 1999. A polymorphism in the regulatory region of the CC-chemokine receptor 5 gene influences perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 to African-American infants. *Journal of virology*, 73: 10264-71.

41. Kostrikis, L.G., Huang, Y., Moore, J.P., Wolinsky, S.M., Zhang, L., Guo, Y., Deutsch, L., Phair, J., Neumann, A.U., Ho, D.D. *et al.* 1998. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nature medicine*, 4: 350-353.
42. Smith, M.W., Dean, M., Carrington, M., Winkler, C., Huttley, G.A., Lomb, D.A., Goedert, J.J., O'Brien, T.R., Jacobson, L.P., Kaslow, R. *et al.* 1997. Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science*, 277: 959-65.
43. Vargas, a.E., da Silva, M.a.L., Silla, L., Chies, J.a.B. 2005. Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease. *Tissue antigens*, 66: 683-90.
44. Abramson, J.H. 2004. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiol Perspect Innov*, 1: 6.
45. Martinson, J.J., Hong, L., Karanickolas, R., Moore, J.P., Kostrikis, L.G. 2000. Global distribution of the CCR2-64I/CCR5-59653T HIV-1 disease-protective haplotype. *AIDS (London, England)*, 14: 483-9.
46. Monticielo, O.A., Chies, J.A., Mucenic, T., Rucatti, G.G., Junior, J.M., da Silva, G.K., Glesse, N., dos Santos, B.P., Brenol, J.C., Xavier, R.M. 2010. Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 19: 280-7.
47. Mummidi, S., Bamshad, M., Ahuja, S.S., Gonzalez, E., Feuillet, P.M., Begum, K., Galvis, M.C., Kostecky, V., Valente, a.J., Murthy, K.K. *et al.* 2000. Evolution of human and non-human primate CC chemokine receptor 5 gene and mRNA. Potential roles for haplotype and mRNA diversity, differential haplotype-specific transcriptional activity, and altered transcription factor binding to polymorphic nucleotides. *The Journal of biological chemistry*, 275: 18946-61.
48. Freutel, S., Gaffal, E., Zahn, S., Bieber, T., Tuting, T., Wenzel, J. 2011. Enhanced CCR5+/CCR3+ T helper cell ratio in patients with active cutaneous lupus erythematosus. *Lupus*, 20: 1300-4.
49. Rossol, M., Pierer, M., Arnold, S., Keysser, G., Burkhardt, H., Baerwald, C., Wagner, U. 2009. Negative association of the chemokine receptor CCR5 d32 polymorphism with systemic inflammatory response, extra-articular symptoms and joint erosion in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, 11: R91.
50. Lee, Y.H., Bae, S.C., Song, G.G. 2012. Association between the chemokine receptor 5 delta32 polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mod Rheumatol*.
51. Martinson, J.J., Chapman, N.H., Rees, D.C., Liu, Y.T., Clegg, J.B. 1997. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet*, 16: 100-3.
52. Martens, H.a., Gross, S., van der Steege, G., Brouwer, E., Berden, J.H.M., de Sevaux, R., Derksen, R.H.W.M., Voskuyl, A.E., Berger, S.P., Navis, G.J. *et al.* 2010. Lack of association of C-C chemokine receptor 5  $\Delta$ 32 deletion

- status with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, lupus nephritis, and disease severity. *The Journal of rheumatology*, 37: 2226-31.
53. Picton, A.C.P., Paximadis, M., Tiemessen, C.T. 2012. CCR5 promoter haplotypes differentially influence CCR5 expression on natural killer and T cell subsets in ethnically divergent HIV-1 uninfected South African populations. *Immunogenetics*, 64: 795-806.
  54. Amoura, Z., Combadiere, C., Faure, S., Parizot, C., Miyara, M., Raphaël, D., Ghillani, P., Debre, P., Piette, J.-C., Gorochoy, G. 2003. Roles of CCR2 and CXCR3 in the T cell-mediated response occurring during lupus flares. *Arthritis and rheumatism*, 48: 3487-96.
  55. Al-Saleh, J., el-Eissawy, S. 2006. The role of T helper cell subsets in pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus and their relation to disease activity. *Egypt J Immunol*, 13: 41-8.
  56. Martens, H.A., Kallenberg, C.G., Bijl, M. 2009. Role of CCR5 Delta32 bp deletion in RA and SLE. *Autoimmunity*, 42: 260-2.
  57. Prahalad, S. 2006. Negative association between the chemokine receptor CCR5-Delta32 polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Genes Immun*, 7: 264-8.
  58. Doodes, P.D., Cao, Y., Hamel, K.M., Wang, Y., Rodeghero, R.L., Kobezda, T., Finnegan, A. 2009. CCR5 is involved in resolution of inflammation in proteoglycan-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 60: 2945-53.
  59. Dobaczewski, M., Xia, Y., Bujak, M., Gonzalez-Quesada, C., Frangogiannis, N.G. 2010. CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *The American journal of pathology*, 176: 2177-87.

## TABLES

**Table 1:** Clinical and laboratory features in European-derived, African-derived and in the whole group of SLE patients:

Patients Features	European-derived	African-derived	Whole
	N/total N (%)	N/total N (%)	N/total N (%)
<b>Females</b>	263/289 (91.0)	87/93 (93.5)	350/382 (91.6)
<b>Age (years)</b>	45.5 ± 15.0	44.7 ± 13.5	45.3 ± 14.7
<b>Age at diagnosis (years)</b>	32.1 ± 13.8	33.7 ± 13.7	32.6 ± 13.9
<b>SLEDAI<sup>a</sup>*</b>	1.0 (0, 4.0)	1.0 (0, 4.0)	1.0 (0, 4.0)
<b>SLICC<sup>b</sup>*</b>	1.0 (0, 2.0)	1.0 (0, 2.0)	1.0 (0, 2.0)
<b>Malar rash</b>	164/289 (56.7)	48/93 (51.6)	214/384 (55.7)
<b>Discoid rash</b>	43/289 (14.9)	15/93 (16.1)	58/384 (15.1)
<b>Photosensitivity</b>	234/289 (81.0)	55/93 (59.1)	290/384 (75.5)
<b>Oral/nasal ulcers</b>	107/289 (37.0)	30/93 (32.3)	137/384 (35.7)
<b>Arthritis</b>	240/289 (83.0)	75/93 (80.6)	315/384 (82.0)
<b>Serositis</b>	83/287 (28.9)	34/93 (36.6)	117/382 (31.6)
<b>Neurologic disorders</b>	35/289 (12.1)	10/93 (10.8)	46/384 (12.0)
<b>Nephritis</b>	124/289 (42.9)	43/93 (46.2)	167/384 (43.5)
<b>Hematological disorders</b>	216/289 (74.7)	82/93 (88.2)	300/384 (78.1)
<b>Immunological disorders</b>	196/286 (68.5)	64/93 (68.8)	261/381 (68.5)
<b>ANA<sup>c</sup></b>	287/288 (99.7)	92/93 (98.9)	381/383 (98.2)

<sup>a</sup> Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index, <sup>b</sup> Systemic Lupus International Collaborating Clinics and <sup>c</sup> Antinuclear Antibody. \* Median, percentiles 25.75. (total numbers can vary due to the lack of data).



**Table 2:** Genotypes of the CCR5 promoter region polymorphisms and frequency of the variant allele in European-derived, African-derived and in the whole group of SLE patients:

Polymorphism	Genotypes	European-derived		African-derived		Whole	
		Patients	Controls	Patients	Controls	Patients	Controls
<b>CCR2-64I</b>	<b>wt/wt (%)</b>	217 (75.9)	194 (80.5)	72 (77.4)	65 (70.6)	293 (76.1)	259 (77.8)
	<b>wt/64I (%)</b>	65 (22.7)	42 (17.4)	18 (19.4)	26 (28.3)	83 (21.6)	68 (20.4)
	<b>64I/64I (%)</b>	4 (1.4)	5 (2.1)	3 (3.2)	1(1.1)	9 (2.3)	6 (1.8)
	Total n	286	241	93	92	385	333
	64I (frequency)	0.13	0.11	0.13	0.15	0.13	0.12
<b>CCR5-59353</b>	<b>CC (%)</b>	82 (28.6)	74 (31.1)	26 (28.3)	32 (24.4)	113 (29.4)	106 (28.7)
	<b>CT (%)</b>	152 (53.0)	116 (48.7)	43 (46.7)	67 (51.2)	195 (50.6)	183 (49.6)
	<b>TT (%)</b>	53 (18.5)	48 (20.2)	23 (25.0)	32 (24.4)	77 ( 20.0)	80 (21.7)
	Total n	287	238	92	131	385	369
	T (frequency)	0.45	0.45	0.48	0.50	0.45	0.46
<b>CCR5-59356</b>	<b>CC (%)</b>	281 (97.6)	234 (98.3)	76 (83.5)	100 (76.4)	363 (94.3)	334 (90.5)
	<b>CT (%)</b>	7 (2.4)	4 (1.7)	14 (15.4)	29 (22.1)	21 (5.5)	33 (8.9)
	<b>TT (%)</b>	0 (0)	0 (0)	1 (1.1)	2 (1.5)	1 (0.3)	2 (0.5)
	Total n	288	238	91	131	385	369
	T (frequency)	0.01	0.01	0.08	0.13	0.03	0.05
<b>CCR5-59402</b>	<b>AA (%)</b>	116 (40.3)	104 (43.7)	49 (53.3)	87 (66.4)	170 (44.0)	191 (51.8)
	<b>AG (%)</b>	144 (50.0)	103 (43.3)	32 (34.8)	43 (32.8)	177 (45.9)	146 (39.6)
	<b>GG (%)</b>	28 (9.7)	31 (13.0)	11 (12.0)	1 (0.8)	39 (10.1)	32 (8.7)
	Total n	288	238	92	131	386	369
	G (frequency)	0.35	0.35	0.29	0.17	0.33	0.28
<b>CCR5-59653</b>	<b>CC (%)</b>	220 (76.4)	194 (81.5)*	70 (76.1)	87 (66.4)	294 (76.2)	281 (76.2)*
	<b>CT (%)</b>	63 (21.9)	38 (16.0)*	19 (20.7)	37 (28.3)	82 (21.2)	75 (20.3)*
	<b>TT (%)</b>	5 (1.7)	6 (2.5)*	3 (3.3)	7 (5.3)	10 (2.6)	13 (3.5)*
	Total n	288	238	92	131	386	369
	T (frequency)	0.13	0.10	0.14	0.19	0.13	0.14

\*Not in Hardy-Weinberg equilibrium.

**Table 3:** Binary Logistic Regression comparisons of the presence or absence of the polymorphic variants of CCR5 promoter region polymorphisms in patients and controls as a whole group and by ethnicity - final model.

Patients vs.controls	Variables	OR <sup>a</sup>	95% CI <sup>b</sup>	Significance
<b>Whole (371 vs. 285)</b>	CCR2 (wt/wt <sup>c</sup> )	0.6	0.1-2.2	0.420
	CCR5-59353 (CC)	1.3	0.7-2.6	0.452
	CCR5-59356 (CC)	0.9	0.4-2.7	0.992
	CCR5-59402 (AA)	0.8	0.4-1.5	0.540
	CCR5-59653 (CC)	1.4	0.4-5.5	0.581
	CCR5Δ32 (wt/wt)	<b>2.5</b>	<b>1.2-5.0</b>	<b>0.030*</b>
	Gender (female)	<b>25.0</b>	<b>15.8-39.4</b>	<b>&lt;&lt;0.001*</b>
	Ethnicity (European)	0.7	0.4-1.2	0.158
<b>European-derived (282 vs. 234)</b>	CCR2 (wt/wt)	0.8	0.2-3.4	0.752
	CCR5-59353 (CC)	1.0	0.5-2.3	0.899
	CCR5-59356 (CC)	0.7	0.1-3.7	0.698
	CCR5-59402 (AA)	1.0	0.5-2.0	0.935
	CCR5-59653 (CC)	1.1	0.2-4.8	0.923
	CCR5Δ32 (wt/wt)	<b>3.5</b>	<b>1.6-7.5</b>	<b>0.003*</b>
	Gender (female)	<b>22.0</b>	<b>13.3-36.4</b>	<b>&lt;&lt;0.001*</b>
<b>African-derived (89 vs. 51)</b>	CCR2 (wt/wt)	0.2	0.01-2.9	0.236
	CCR5-59353 (CC)	2.1	0.4-10.0	0.340
	CCR5-59356 (CC)	0.8	0.2-3.7	0.813
	CCR5-59402 (AA)	0.5	0.1-1.8	0.277
	CCR5-59653 (CC)	2.8	0.2-35.3	0.425
	CCR5Δ32 (wt/wt)	0.1	0.01-1.5	0.105
	Gender (female)	<b>58.4</b>	<b>16.8-203.2</b>	<b>&lt;&lt;0.001*</b>

<sup>a</sup> OR: Odds Ratio, <sup>b</sup> CI: confidence Interval and <sup>c</sup> wt/wt: Homozygous for wild type allele.

\*Bonferroni corrected *p* values.

**Table 4:** Groups that presented significant linkage disequilibrium between polymorphisms:

<b>Polymorphisms</b>	<b>CCR2-64I</b>	<b>CCR5-59353</b>	<b>CCR5-59356</b>	<b>CCR5-59402</b>	<b>CCR5-59653</b>
<b>CCR2-64I</b>	-	-	-	-	-
<b>CCR5-59353</b>	CAD	-	-	-	-
<b>CCR5-59356</b>	C, CAD	C, CED, CAD, L, LED, LAD	-	-	-
<b>CCR5-59402</b>	CAD	CAD, LAD	C, CAD, L, LAD	-	-
<b>CCR5-59653</b>		CED, CAD, LAD	CAD	C, CED, CAD, LAD	-
<b>CCR5delta32</b>		LAD			C, CED

C: Control group as a whole, CED: European-derived control group, CAD: African-derived control group, L: Lupus patient group as a whole, LED: Lupus European-derived patient group, LAD: Lupus African-derived patient group.

**Table 5:** Haplotype frequencies and comparisons between patients and controls in European and African-derived groups:

HAPLOTYPES		European-derived		African-derived	
		Patients	Controls	Patients	Controls
<b>HHA or HHB</b>	V T C A C wt (%)	51 (9.1)	44 (9.3)	<b>18 (10.0)<sup>b</sup></b>	<b>53 (20.5)<sup>b</sup></b>
<b>HHC</b>	V T C G C wt (%)	192 (34.2)	161 (34.1)	<b>53 (29.4)<sup>c</sup></b>	<b>45 (17.4)<sup>c</sup></b>
<b>HHD</b>	V T T A C wt (%)	7 (1.2)	4 (0.8)	16 (8.9)	33 (12.7)
<b>HHE or HHG*1</b>	V C C A C wt (%)	229 (40.8)	176 (37.3)	60 (33.3)	75 (29.0)
<b>HHF*1</b>	V C C A T wt (%)	3 (0.5)	2 (0.4)	2 (1.1)	8 (3.1)
<b>HHF*2</b>	I C C A T wt (%)	67 (11.9)	48 (10.2)	23 (12.8)	42 (16.2)
<b>HHG*2</b>	V C C A C d32 (%)	<b>11 (2.0)<sup>a</sup></b>	<b>34 (7.2)<sup>a</sup></b>	<b>7 (3.9)<sup>d</sup></b>	<b>2 (0.8)<sup>d</sup></b>
<b>Rare bearing d32</b>	- - - - - d32 (%)	4 (0.7)	1 (0.2)	0 (0)	0 (0)
<b>Rare not bearing d32</b>	- - - - - wt (%)	8 (1.4)	2 (0.4)	1 (0.6)	1 (0.4)
<b>Total</b>		572	472	180	259
<b>Significance (<math>p_{corrected}</math>)</b>		<b>0.006</b>		<b>0.002</b>	

<sup>a</sup> residual  $p= 2.9E-5$ , <sup>b</sup> residual  $p= 0.003$ , <sup>c</sup> residual  $p= 0.003$  and <sup>d</sup> residual  $p= 0.023$ .

#### 4. DISCUSSÃO

O LES é uma doença autoimune inflamatória crônica que possui uma etiologia complexa. Sabe-se que fatores imunológicos, genéticos e ambientais atuam em conjunto para o estabelecimento da doença. Diversos fatores participam da patogênese da doença, dentre eles defeitos na via da apoptose, alterações no sistema complemento, e função anormal de linfócitos T e B, incluindo alterações no balanço de citocinas e quimiocinas (Lit, 2006; Truedsson, 2007; Wong, 2008; Gullstrand, 2009; Schiffer, 2009; Jacob, 2010; Munoz, 2010; Moulton, 2011; Shao, 2011). As quimiocinas e seus receptores são fundamentais na regulação da migração de leucócitos na inflamação e acredita-se que elas possam ter um papel importante na patogênese de doenças autoimunes, incluindo o LES (Eriksson, 2003; Mamtani, 2008; Li, 2010). Diversos estudos abordaram o papel de quimiocinas e seus receptores no LES, porém, principalmente se tratando dos receptores de quimiocinas CCR5 e CCR2, não existe um consenso. Devido à necessidade de mais estudos na área, este trabalho teve por objetivo analisar polimorfismos nos genes dos receptores CCR2 e CCR5 e sua possível associação com o desenvolvimento e com as manifestações clínicas e laboratoriais do LES.

Este é o primeiro estudo realizado a respeito do papel de polimorfismos na região promotora do CCR5, incluindo o CCR2-64I, em pacientes com LES do Sul do Brasil. O presente trabalho corrobora os achados prévios de nosso grupo em relação ao envolvimento do CCR5delta32 na proteção ao LES em pacientes Euro-descendentes e na susceptibilidade à nefrite classe IV em pacientes Afro-descendentes e em pacientes com LES como um todo. No estudo prévio, pacientes Euro-descendentes apresentaram uma menor frequência do polimorfismo CCR5delta32 (em outras palavras, uma frequência maior de homozigotos para o alelo selvagem que é responsável pela produção normal deste receptor de superfície celular) quando comparados com controles da mesma etnia, sugerindo que a falta do CCR5 na superfície das células do sistema imunológico pode ser um fator de proteção para o SLE (Schahren JS *et al.* dados não-publicados).

No presente trabalho, o polimorfismo CCR5delta32 foi incluído no modelo de regressão logística binária e, mesmo quando controlando por gênero e pelos polimorfismos da região promotora do *CCR5*, incluindo o CCR2-64I, ele foi o único polimorfismo associado com proteção à doença. Além disto, o haplótipos HHG\*2, contendo o alelo CCR5delta32, foi o único haplótipo associado com proteção ao LES em pacientes Euro-descendentes. Interessantemente, esses achados se opõem aos resultados obtidos por Mamtani e colaboradores, os quais indicam que o haplótipos HHG\*2 é um fator de risco para o desenvolvimento do LES (Mamtani, 2008). Entretanto, convém ressaltar que os trabalhos citados envolvem populações humanas com potenciais diferenças em seus *backgrounds* genéticos. Interessantemente, um estudo recente realizado na Alemanha indicou que a razão CCR5+/CCR3+ em linfócitos T auxiliares estava aumentada em pacientes com Lúpus Cutâneo ativo (Freutel, 2011), concordando com nossos achados. Além disto, outra pesquisa alemã demonstrou que a presença do CCR5delta32 tem um efeito protetor no desenvolvimento de artrite reumatoide (AR) (Rossol, 2009), doença autoimune que também foi associada à reduzida expressão do alelo CCR5delta32 em pacientes euro-descendentes em uma meta-análise (Lee, 2012).

Na análise do grupo de Afro-descendentes, as frequências dos haplótipos HHA/HHB, HHC e HHG\*2 foram diferentes em pacientes e controles. Neste grupo, a frequência do haplótipo HHG\*2 foi levemente maior em pacientes do que em controles, o oposto em relação aos resultados em Euro-descendentes e corroborando os achados de Mamtani e colaboradores (Mamtani, 2008). Este resultado é interessante devido ao fato de que o haplótipos HHG\*2 contém o alelo CCR5delta32, sendo que este alelo não está originalmente presente em populações nativas africanas e sua presença em Afro-descendentes resulta de miscigenação. Nenhum dos estudos a respeito do envolvimento do CCR5delta32 no LES abordou pacientes Afro-descendentes (Aguilar, 2003; Mamtani, 2008; Martens, 2010). Picton e colaboradores descreveram que os haplótipos da região promotora do *CCR5* influenciam a expressão do CCR5 em células NK e em certos subtipos de linfócitos T em populações sul-africanas (Picton, 2012). Eles demonstraram que o haplótipo HHC aumentou a expressão de CCR5 em células

NK (independente da presença do CCR5delta32) e em linfócitos T CD8+ (apenas com a presença do CCR5delta32) em indivíduos caucasoides sul-africanos e que o haplótipo HHA estava associado com a expressão reduzida do CCR5 em linfócitos T CD8+. Levando em conta estes achados podemos sugerir que a frequência reduzida de HHA e elevada de HHC e HHG\*2 nos pacientes afro-descendentes poderia estar relacionada ao aumento da expressão do CCR5 em subtipos celulares específicos e à redução desta expressão em células do sistema imunológico de forma geral.

Em relação ao polimorfismo CCR2-64I, nenhuma associação direta com o LES foi encontrada, corroborando os resultados de Aguilar e colaboradores (Aguilar, 2003). Os resultados em relação ao CCR2 presentes na literatura são conflitantes. O estudo conduzido por Amoura e colaboradores indicou que linfócitos T CD4+, CCR2+ estão em quantidade reduzida em pacientes franceses durante a doença ativa (Amoura, 2003), entretanto, o estudo conduzido por Li e colaboradores indica que a expressão do CCR2 é maior em pacientes chineses com a doença ativa (Li, 2010). Este mesmo estudo também reportou níveis aumentados do mRNA do CCR5 em pacientes quando comparados com controles, concordando com os resultados de Al-Saleh e colaboradores que observaram uma expressão média significativamente elevada de CCR5 e CXCR3 na superfície de linfócitos T CD4+ de pacientes com a doença ativa em relação à controles e pacientes em remissão (Al-Saleh, 2006).

Quanto às manifestações clínicas, apenas o CCR5delta32 foi confirmado como fator de susceptibilidade para nefrite classe IV como previamente discutido (Schauen JS *et al.* dados não-publicados), mesmo quando controlando pela presença de polimorfismos da região promotora do CCR5, incluindo o CCR2-64I, gênero e origem étnica.

O papel aparentemente controverso do CCR5 descrito neste trabalho não é uma novidade em doenças autoimunes. Este assunto já foi extensivamente debatido em AR (Pralhad, 2006; Martens, 2009; Lee, 2012) e, de maneira geral, parece mais provável que a expressão reduzida do CCR5 seja um fator protetor contra o desenvolvimento de AR. No presente estudo, o LES parece seguir a mesma tendência. De maneira global, a expressão reduzida do CCR5 parece

conferir proteção contra o desenvolvimento do LES, entretanto, alguns pontos devem ser discutidos. Primeiro, a origem étnica é um fator extremamente importante relacionado ao LES e à expressão do CCR5, portanto, merece atenção especial na análise e interpretação dos dados. Segundo, alguns dos estudos citados nesta discussão são baseados em números amostrais pequenos, o que pode incluir um viés em suas conclusões. Terceiro, o papel aparentemente ambíguo do CCR5 na patogênese do LES pode ser decorrente da presença deste receptor na superfície de células com diferentes funções no sistema imunológico, como, por exemplo, linfócitos T auxiliares e T regulatórios.

A presença do CCR5 na superfície das células do sistema imunológico auxilia na sua migração para os tecidos, promovendo a inflamação. Por outro lado, o CCR5 também pode estar envolvido na resolução da inflamação, sendo assim, a ausência deste receptor também poderia levar a uma inflamação exacerbada. Estudos prévios sugeriram mecanismos pelos quais a falta do CCR5 poderia resultar em inflamação exacerbada. Uma sugestão seria que a falta deste receptor na superfície de células T regulatórias poderia prejudicar seu recrutamento para os tecidos inflamados, prejudicando o processo de resolução da inflamação (Doodes, 2009; Dobaczewski, 2010). Outro mecanismo sugerido seria a ação do CCR5 como um receptor chamariz, presente na superfície de linfócitos T e neutrófilos apoptóticos, que se ligam à quimiocinas locais, porém já não possuem mais a capacidade de sinalização intracelular, servindo como um tampão imunológico que reduz a concentração de quimiocinas no local, diminuindo o recrutamento de células inflamatórias e auxiliando na resolução da inflamação (Ariel, 2006). Este mecanismo parece ser o mais provável segundo Turner e colaboradores (Turner, 2012).

Este estudo possui algumas limitações e perspectivas. As limitações principais são referentes ao tamanho amostral. Primeiro, o tamanho amostral do grupo controle, principalmente dos Euro-descendentes, é relativamente pequeno e não tem a mesma proporção de homens e mulheres. Segundo, o tamanho amostral dos pacientes, especialmente dos Afro-descendentes, também é relativamente pequeno, principalmente, quando os pacientes são estratificados por etnia para análise das manifestações clínicas. Apesar destas limitações, todas as



análises foram controladas por gênero e etnia quando necessário. Terceiro, níveis de expressão do CCR5 e fatores que podem influenciar estes níveis não foram analisados, o que pode adicionar um viés ao estudo. As perspectivas deste trabalho são: repetir as análises de haplótipos utilizando outro software para verificar a consistência dos dados gerados, verificar uma possível associação entre os haplótipos e as manifestações clínicas/laboratoriais do LES e realizar a análise dos diplótipos, verificando suas frequências e a possível associação com a doença.

Em conclusão, o presente estudo indica que polimorfismos na região promotora do CCR5 podem atuar como modificadores no LES e que o *background* genético deve ser cuidadosamente considerado em estudos sobre o LES e receptores de quimiocinas. Os resultados observados reforçam o papel do polimorfismo CCR5delta32 como um fator de proteção para o desenvolvimento do LES em Euro-descendentes e como um fator de susceptibilidade à nefrite classe IV em pacientes Afro-descendentes. Além disto, também foram descritos a redução da frequência dos haplótipos HHA/HHB e o aumento da frequência de HHC e HHG\*2 em pacientes Afro-descendentes, o que pode estar associado com uma maior expressão do CCR5 em subtipos específicos celulares e com uma menor expressão deste receptor de maneira geral. Estes resultados são mais uma evidência de que polimorfismos na região promotora do CCR5 possivelmente atuam na patogênese de doenças autoimunes e enfatizam a necessidade de mais estudos na área.

## REFERÊNCIAS:

- Adelowo OO and Oguntona SA (2009). Pattern of systemic lupus erythematosus among Nigerians. *Clin Rheumatol* 28: 699-703.
- Aguilar F, Núñez-Roldán A, Torres B, Wichmann I, Sánchez-Román J and González-Escribano MF (2003). Chemokine receptor CCR2/CCR5 polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology* 30: 1770-1774.
- Al-Abdulhadi Sa and Al-Rabia MWO (2010). Linkage and haplotype analysis for chemokine receptors clustered on chromosome 3p21.3 and transmitted in family pedigrees with asthma and atopy. *Annals of Saudi medicine* 30: 115-122.
- Al-Saleh J and el-Eissawy S (2006). The role of T helper cell subsets in pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus and their relation to disease activity. *Egypt J Immunol* 13: 41-48.
- Alcocer-Varela J and Alarcon-Segovia D (1982). Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 69: 1388-1392.
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM and Berger EA (1996). CC CKR5: a CCL5, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272: 1955-1958.
- Amoura Z, Combadiere C, Faure S, Parizot C, Miyara M, Raphaël D, Ghillani P, Debre P, Piette J-C and Gorochov G (2003). Roles of CCR2 and CXCR3 in the T cell-mediated response occurring during lupus flares. *Arthritis and rheumatism* 48: 3487-3496.
- Ariel A, Fredman G, Sun Y-P, Kantarci A, Van Dyke TE, Luster AD and Serhan CN (2006). Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nature immunology* 7: 1209-1216.
- Aslanidis S, Pырpasopoulou A, Kontotasios K, Doulas S and Zamboulis C (2008). Parvovirus B19 infection and systemic lupus erythematosus: Activation of an aberrant pathway? *Eur J Intern Med* 19: 314-318.
- Bae SC, Koh HK, Chang DK, Kim MH, Park JK and Kim SY (2001). Reliability and validity of systemic lupus activity measure-revised (SLAM-R) for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 10: 405-409.
- Bastian HM, Roseman JM, McGwin G, Jr., Alarcon GS, Friedman AW, Fessler BJ, Baethge BA and Reveille JD (2002). Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. XII. Risk factors for lupus nephritis after diagnosis. *Lupus* 11: 152-160.
- Block SR (2006). A brief history of twins. *Lupus* 15: 61-64.
- Boldt AB, Culpi L, Tsuneto LT, Souza IR, Kun JF and Petzl-Erler ML (2009). Analysis of the CCR5 gene coding region diversity in five South American populations reveals two new non-synonymous alleles in Amerindians and high CCR5\*D32 frequency in Euro-Brazilians. *Genet Mol Biol* 32: 12-19.

Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D and Chang CH (1992). Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 35: 630-640.

Borchers AT, Leibushor N, Naguwa SM, Cheema GS, Shoenfeld Y and Gershwin ME Lupus nephritis: a critical review. *Autoimmun Rev* 12: 174-194.

Borchers AT, Naguwa SM, Shoenfeld Y and Gershwin ME (2010). The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews* 9: A277-287.

Borkar M, Tripathi G and Kumar R (2011). Chemokine ( CCR ) and fractalkine ( CX3CR ) receptors and end stage renal disease. *Inflammation Research*: 399-407.

Boumpas DT, Furie R, Manzi S, Illei GG, Wallace DJ, Balow JE and Vaishnav A (2003). A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis. *Arthritis Rheum* 48: 719-727.

Bournazou I, Pound JD, Duffin R, Bournazos S, Melville LA, Brown SB, Rossi AG and Gregory CD (2009). Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. *J Clin Invest* 119: 20-32.

Carvalho MWP, Leboutte APM, Oliveira SF, Sousa SMB, Klautau-Guimarães MdN and Simões AL (2004). CCR5D32mutation in three Brazilian populations of predominantly Sub-Saharan African ancestry. *Genetics and Molecular Biology* 27: 321-325.

Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Mejia JC, Aydintug AO, Chwalinska-Sadowska H, de Ramon E, *et al.* (2003). Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore)* 82: 299-308.

Chalaris A, Rabe B, Paliga K, Lange H, Laskay T, Fielding CA, Jones SA, Rose-John S and Scheller J (2007). Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood* 110: 1748-1755.

Chan RW, Lai FM, Li EK, Tam LS, Chow KM, Li PK and Szeto CC (2006). Messenger RNA expression of CCL5 in the urinary sediment of patients with lupus nephritis. *Nephrology (Carlton)* 11: 219-225.

Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ and Coughlin SR (1994). Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2752-2756.

Chies JaB and Hutz MH (2003). High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]* 36: 71-75.

Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, *et al.* (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85: 1135-1148.

Colobran R, Pujol-Borrell R, Armengol MP and Juan M (2007). The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity. *Clin Exp Immunol* 148: 208-217.

Combadiere C, Ahuja SK, Tiffany HL and Murphy PM (1996). Cloning and functional expression of CC CKR5, a human monocyte CC chemokine receptor selective for MIP-1(alpha), MIP-1(beta), and CCL5. *J Leukoc Biol* 60: 147-152.

Crispin JC, Keenan BT, Finnell MD, Bermas BL, Schur P, Massarotti E, Karlson EW, Fitzgerald LM, Ergin S, Kyttaris VC, *et al.* (2010). Expression of CD44 variant isoforms CD44v3 and CD44v6 is increased on T cells from patients with systemic lupus erythematosus and is correlated with disease activity. *Arthritis Rheum* 62: 1431-1437.

Croker JA and Kimberly RP (2005). Genetics of susceptibility and severity in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 17: 529-537.

Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, *et al.* (1996). Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 273: 1856-1862.

Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, Walker A and Mack TM (1992). A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 35: 311-318.

Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, *et al.* (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381: 661-666.

Dobaczewski M, Xia Y, Bujak M, Gonzalez-Quesada C and Frangogiannis NG (2010). CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *The American journal of pathology* 176: 2177-2187.

Dolff S, Bijl M, Huitema MG, Limburg PC, Kallenberg CG and Abdulahad WH (2011). Disturbed Th1, Th2, Th17 and T(reg) balance in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 141: 197-204.

Doodes PD, Cao Y, Hamel KM, Wang Y, Rodeghero RL, Kobezda T and Finnegan A (2009). CCR5 is involved in resolution of inflammation in proteoglycan-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism* 60: 2945-2953.

Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG and Doms RW (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85: 1149-1158.

Dörner T, Giesecke C and Lipsky PE (2011). Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE. *Arthritis research & therapy* 13: 243.

Dourmishchev L, Kamenarska Z, Hristova M, Dodova R, Kaneva R and Mitev V Association of TNF-alpha polymorphisms with adult dermatomyositis and systemic lupus erythematosus in Bulgarian patients. *Int J Dermatol* 51: 1467-1473.

Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, *et al.* (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381: 667-673.

Duddy ME, Alter A and Bar-Or A (2004). Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J Immunol* 172: 3422-3427.

Elkon KB and Stone VV Type I interferon and systemic lupus erythematosus. *J Interferon Cytokine Res* 31: 803-812.

Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, *et al.* (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461: 282-286.

Enghard P, Humrich JY, Rudolph B, Rosenberger S, Biesen R, Kuhn A, Manz R, Hiepe F, Radbruch A, Burmester GR, *et al.* (2009). CXCR3+CD4+ T cells are enriched in inflamed kidneys and urine and provide a new biomarker for acute nephritis flares in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis Rheum* 60: 199-206.

Eriksson C, Eneslatt K, Ivanoff J, Rantapaa-Dahlqvist S and Sundqvist KG (2003). Abnormal expression of chemokine receptors on T-cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 12: 766-774.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL and Henson PM (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148: 2207-2216.

Frade JM, Mellado M, del Real G, Gutierrez-Ramos JC, Lind P and Martinez AC (1997). Characterization of the CCR2 chemokine receptor: functional CCR2 receptor expression in B cells. *J Immunol* 159: 5576-5584.

Freutel S, Gaffal E, Zahn S, Bieber T, Tuting T and Wenzel J (2011). Enhanced CCR5+/CCR3+ T helper cell ratio in patients with active cutaneous lupus erythematosus. *Lupus* 20: 1300-1304.

Garlanda C, Bottazzi B, Bastone A and Mantovani A (2005). Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol* 23: 337-366.

Gateva V, Sandling JK, Hom G, Taylor KE, Chung SA, Sun X, Ortmann W, Kosoy R, Ferreira RC, Nordmark G, *et al.* (2009). A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 41: 1228-1233.

Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, Bacon P, Bombardieri S, Hanly J, Hay E, *et al.* (1996). The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 39: 363-369.

Gladman DD, Ibanez D and Urowitz MB (2002). Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol* 29: 288-291.

Glesse N, Monticielo OA, Mattevi VS, Brenol JC, Xavier RM, da Silva GK, Dos Santos BP, Rucatti GG and Chies JA (2010). Association of mannose-binding lectin 2 gene polymorphic variants with susceptibility and clinical progression in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 29: 983-990.

Gómez-Reino JJ, Pablos JL, Carreira PE, Santiago B, Serrano L, Vicario JL, Balsa a, Figueroa M and de Juan MD (1999). Association of rheumatoid arthritis with a functional chemokine receptor, CCR5. *Arthritis and rheumatism* 42: 989-992.

Gualtierotti R, Biggioggero M, Penatti aE and Meroni PL (2010). Updating on the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews* 10: 3-7.

Gude DR, Alvarez SE, Paugh SW, Mitra P, Yu J, Griffiths R, Barbour SE, Milstien S and Spiegel S (2008). Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. *FASEB J* 22: 2629-2638.

Guerra SG, Vyse TJ and Cunninghame Graham DS (2012). The genetics of lupus: a functional perspective. *Arthritis Res Ther* 14: 211.

Gullstrand B, Martensson U, Sturfelt G, Bengtsson AA and Truedsson L (2009). Complement classical pathway components are all important in clearance of apoptotic and secondary necrotic cells. *Clin Exp Immunol* 156: 303-311.

Guo Q, Lu X, Miao L, Wu M, Lu S and Luo P Analysis of clinical manifestations and pathology of lupus nephritis: a retrospective review of 82 cases. *Clin Rheumatol* 29: 1175-1180.

Hase K, Tani K, Shimizu T, Ohmoto Y, Matsushima K and Sone S (2001). Increased CCR4 expression in active systemic lupus erythematosus. *J Leukoc Biol* 70: 749-755.

Herfarth H, Pollok-kopp B, Go M and Press A (2001). Polymorphism of CC chemokine receptors CCR2 and CCR5 in Crohn ' s disease. *77*: 113-117.

Herrmann M, Winkler T, Gaipf U, Lorenz H, Geiler T and Kalden JR (2000). Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Immunol* 123: 28-35.

Hochberg MC (1997). Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40: 1725.

Hochberg MC (2003). The History of Lupus Erythematosus.

Hopkinson ND, Doherty M and Powell RJ (1994). Clinical features and race-specific incidence/prevalence rates of systemic lupus erythematosus in a geographically complete cohort of patients. *Ann Rheum Dis* 53: 675-680.

Huang W, Sinha J, Newman J, Reddy B, Budhai L, Furie R, Vaishnav A and Davidson A (2002). The effect of anti-CD40 ligand antibody on B cells in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 46: 1554-1562.

Isenberg DA, Rahman A, Allen E, Farewell V, Akil M, Bruce IN, D'Cruz D, Griffiths B, Khamashta M, Maddison P, *et al.* (2005). BILAG 2004. Development and initial validation of an updated version of the British Isles Lupus Assessment Group's disease activity index for patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 44: 902-906.

Jacob N and Stohl W (2010). Autoantibody-dependent and autoantibody-independent roles for B cells in systemic lupus erythematosus: past, present, and future. *Autoimmunity* 43: 84-97.

Kaneko H, Ogasawara H, Naito T, Akimoto H, Lee S, Hishikawa T, Sekigawa I, Tokano Y, Takasaki Y, Hirose SI, *et al.* (1999). Circulating levels of beta-chemokines in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 26: 568-573.

Kassi E and Moutsatsou P (2010). Estrogen receptor signaling and its relationship to cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2010: 317452.

Kato K, Santana-Sahagun E, Rassenti LZ, Weisman MH, Tamura N, Kobayashi S, Hashimoto H and Kipps TJ (1999). The soluble CD40 ligand sCD154 in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 104: 947-955.

Katschke KJ, Jr., Rottman JB, Ruth JH, Qin S, Wu L, LaRosa G, Ponath P, Park CC, Pope RM and Koch AE (2001). Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44: 1022-1032.

Kishore U and Reid KB (2000). C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology* 49: 159-170.

Kohem CL, Brenol JCT, Xavier RM, Bredemeier M, Brenol CV, Dedavid e Silva TL, de Castilhos Mello a, Cañedo aD, Neves aG and Chies JaB (2007). The chemokine receptor CCR5 genetic polymorphism and expression in rheumatoid arthritis patients. *Scandinavian journal of rheumatology* 36: 359-364.

Koshy M, Berger D and Crow MK (1996). Increased expression of CD40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes. *J Clin Invest* 98: 826-837.

Koutouzov S, Mathian A and Dalloul A (2006). Type-I interferons and systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 5: 554-562.

Kravitz MS and Shoenfeld Y (2006). Autoimmunity to protective molecules: is it the perpetuum mobile (vicious cycle) of autoimmune rheumatic diseases? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2: 481-490.

Lau CS, Yin G and Mok MY (2006). Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview. *Lupus* 15: 715-719.

Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M and Wesselborg S (2004). Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 14: 277-287.

Lastrup H, Voss A, Green A and Junker P (2009). Occurrence of systemic lupus erythematosus in a Danish community: an 8-year prospective study. *Scand J Rheumatol* 38: 128-132.

Lee HT, Shiao YM, Wu TH, Chen WS, Hsu YH, Tsai SF and Tsai CY Serum BLC/CXCL13 concentrations and renal expression of CXCL13/CXCR5 in patients with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *J Rheumatol* 37: 45-52.

Lee YH, Bae SC and Song GG (2012). Association between the chemokine receptor 5 delta32 polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mod Rheumatol*.

Lee YH and Song GG Associations between TNFAIP3 gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Genet Test Mol Biomarkers* 16: 1105-1110.

Li Y-m, Chen Z-q, Yao X, Yang A-z, Li A-s, Liu D-m and Gong J-q (2010). mRNA Expression of Chemokine Receptors on Peripheral Blood Mononuclear Cells and Correlation with Clinical Features in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Chinese Medical Sciences Journal* 25: 162-168.

Liang MH, Socher SA, Larson MG and Schur PH (1989). Reliability and validity of six systems for the clinical assessment of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 32: 1107-1118.

Lima G, Soto-Vega E, Atisha-Fregoso Y, Sanchez-Guerrero J, Vallejo M, Vargas-Alarcon G and Llorente L (2007). MCP-1, CCL5, and SDF-1 polymorphisms in Mexican patients with systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 68: 980-985.

Lit LC, Wong CK, Tam LS, Li EK and Lam CW (2006). Raised plasma concentration and ex vivo production of inflammatory chemokines in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 65: 209-215.

Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA and Landau NR (1996). Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86: 367-377.

Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M and Moser B (1994). Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *FASEB J* 8: 1055-1060.

Lu J, Kwan BC, Lai FM, Choi PC, Tam LS, Li EK, Chow KM, Wang G, Li PK and Szeto CC Gene expression of TWEAK/Fn14 and IP-10/CXCR3 in glomerulus and tubulointerstitium of patients with lupus nephritis. *Nephrology (Carlton)* 16: 426-432.

Lu MM, Wang J, Pan HF, Chen GM, Li J, Cen H, Feng CC and Ye DQ (2012). Increased serum CCL5 in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 32: 1231-1233.

Mageed RA and Prud'homme GJ (2003). Immunopathology and the gene therapy of lupus. *Gene Ther* 10: 861-874.

Malafronte P, Vieira JM, Jr., Pereira AC, Krieger JE, Barros RT and Woronik V Association of the MCP-1 -2518 A/G polymorphism and no association of its receptor CCR2 -64 V/I polymorphism with lupus nephritis. *J Rheumatol* 37: 776-782.

Mamtani M, Rovin B, Brey R, Camargo JF, Kulkarni H, Herrera M, Correa P, Holliday S, Anaya J-M and Ahuja SK (2008). CCL3L1 gene-containing segmental duplications and polymorphisms in CCR5 affect risk of systemic lupus erythematosis. *Annals of the rheumatic diseases* 67: 1076-1083.

Mamula MJ, Fatenejad S and Craft J (1994). B cells process and present lupus autoantigens that initiate autoimmune T cell responses. *J Immunol* 152: 1453-1461.

Manfredi AA, Rovere-Querini P, Bottazzi B, Garlanda C and Mantovani A (2008). Pentraxins, humoral innate immunity and tissue injury. *Curr Opin Immunol* 20: 538-544.

Mangano a, Gonzalez E, Dhanda R, Catano G, Bamshad M, Bock a, Duggirala R, Williams K, Mummidi S, Clark Ra, *et al.* (2001). Concordance between the CC chemokine receptor 5 genetic determinants that alter risks of transmission and disease progression in children exposed perinatally to human immunodeficiency virus. *The Journal of infectious diseases* 183: 1574-1585.

Marshak-Rothstein A and Rifkin IR (2007). Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. *Annu Rev Immunol* 25: 419-441.

Martens Ha, Gross S, van der Steege G, Brouwer E, Berden JHM, de Sevaux R, Derksen RHWM, Voskuyl AE, Berger SP, Navis GJ, *et al.* (2010). Lack of association of C-C chemokine receptor 5  $\Delta$ 32 deletion status with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, lupus nephritis, and disease severity. *The Journal of rheumatology* 37: 2226-2231.

Martens HA, Kallenberg CG and Bijl M (2009). Role of CCR5 Delta32 bp deletion in RA and SLE. *Autoimmunity* 42: 260-262.



Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT and Clegg JB (1997). Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet* 16: 100-103.

Martinson JJ, Hong L, Karanicolas R, Moore JP and Kostrikis LG (2000). Global distribution of the CCR2-64I/CCR5-59653T HIV-1 disease-protective haplotype. *AIDS (London, England)* 14: 483-489.

McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA, Jr., Ramsey-Goldman R, LaPorte RE and Kwoh CK (1995). Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum* 38: 1260-1270.

McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF and Murphy PM (1998). CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet* 352: 866-870.

Monticielo OA, Chies JA, Mucenic T, Rucatti GG, Junior JM, da Silva GK, Glesse N, dos Santos BP, Brenol JC and Xavier RM (2010). Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 19: 280-287.

Monticielo OA, Mucenic T, Xavier RM, Brenol JC and Chies JA (2008). The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 27: 413-419.

Moulton VR and Tsokos GC (2011). Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy* 13: 207.

Mummidi S, Ahuja SS, McDaniel BL and Ahuja SK (1997). The human CC chemokine receptor 5 (CCR5) gene. Multiple transcripts with 5'-end heterogeneity, dual promoter usage, and evidence for polymorphisms within the regulatory regions and noncoding exons. *The Journal of biological chemistry* 272: 30662-30671.

Mummidi S, Bamshad M, Ahuja SS, Gonzalez E, Feuillet PM, Begum K, Galvis MC, KostECKI V, Valente aJ, Murthy KK, *et al.* (2000). Evolution of human and non-human primate CC chemokine receptor 5 gene and mRNA. Potential roles for haplotype and mRNA diversity, differential haplotype-specific transcriptional activity, and altered transcription factor binding to polymorphic nucleotides. *The Journal of biological chemistry* 275: 18946-18961.

Munoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA and Herrmann M (2010). The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol* 6: 280-289.

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert Ca, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ and Power Ca (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological reviews* 52: 145-176.

Myers SJ, Wong LM and Charo IF (1995). Signal transduction and ligand specificity of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor in transfected embryonic kidney cells. *J Biol Chem* 270: 5786-5792.

Nakashima CA, Galhardo AP, Silva JF, Fiorenzano GR, Santos AB, Leite MF, Nogueira MA, Menolli PV and Menolli RA (2011). Incidence and clinical-laboratory aspects of systemic lupus erythematosus in a Southern brazilian city. *Rev Bras Reumatol* 51: 231-239.

Nakayama EE, Tanaka Y, Nagai Y and Shioda T (2004). A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform. 2.

Navratilova Z (2006). Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 150: 191-204.

Nowling TK and Gilkeson GS (2011). Mechanisms of tissue injury in lupus nephritis. Arthritis research & therapy 13: 250.

O'Neill S and Cervera R (2010). Systemic lupus erythematosus. Best practice & research. Clinical rheumatology 24: 841-855.

Panda AK, Parida JR, Tripathy R, Pattanaik SS, Ravindran B and Das BK (2013). Low producer MBL genotypes are associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Odisha, India. Hum Immunol 74: 114-119.

Pedroza LS, Sauma MF, Vasconcelos JM, Takeshita LY, Ribeiro-Rodrigues EM, Sastre D, Barbosa CM, Chies JA, Veit TD, Lima CP, *et al.* (2011). Systemic lupus erythematosus: association with KIR and SLC11A1 polymorphisms, ethnic predisposition and influence in clinical manifestations at onset revealed by ancestry genetic markers in an urban Brazilian population. Lupus 20: 265-273.

Perez de Lema G, Maier H, Franz TJ, Escribese M, Chilla S, Segerer S, Camarasa N, Schmid H, Banas B, Kalaydjiev S, *et al.* (2005). Chemokine receptor Ccr2 deficiency reduces renal disease and prolongs survival in MRL/lpr lupus-prone mice. J Am Soc Nephrol 16: 3592-3601.

Perez de Lema G, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F and Schlondorff D (2001). Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. J Am Soc Nephrol 12: 1369-1382.

Peter C, Waibel M, Radu CG, Yang LV, Witte ON, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S and Lauber K (2008). Migration to apoptotic "find-me" signals is mediated via the phagocyte receptor G2A. J Biol Chem 283: 5296-5305.

Petri M, Orbai AM, Alarcon GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, Bruce IN, Isenberg D, Wallace DJ, Nived O, *et al.* (2012). Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 64: 2677-2686.

Picton ACP, Paximadis M and Tiemessen CT (2012). CCR5 promoter haplotypes differentially influence CCR5 expression on natural killer and T cell subsets in ethnically divergent HIV-1 uninfected South African populations. Immunogenetics 64: 795-806.

Prahalad S (2006). Negative association between the chemokine receptor CCR5-Delta32 polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. Genes Immun 7: 264-268.

Rahman A and Isenberg DA (2008). Systemic lupus erythematosus. N Engl J Med 358: 929-939.

Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW and Charo IF (1996). Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for CCL5, MIP-1beta, and MIP-1alpha. J Biol Chem 271: 17161-17166.

Rawal N, Rajagopalan R and Salvi VP (2008). Activation of complement component C5: comparison of C5 convertases of the lectin pathway and the classical pathway of complement. J Biol Chem 283: 7853-7863.

Reveille JD, Bartolucci A and Alarcon GS (1990). Prognosis in systemic lupus erythematosus. Negative impact of increasing age at onset, black race, and thrombocytopenia, as well as causes of death. *Arthritis Rheum* 33: 37-48.

Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K and Lambris JD (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11: 785-797.

Rodriguez-Frade JM, Mellado M and Martinez AC (2001). Chemokine receptor dimerization: two are better than one. *Trends Immunol* 22: 612-617.

Rossol M, Pierer M, Arnold S, Keysser G, Burkhardt H, Baerwald C and Wagner U (2009). Negative association of the chemokine receptor CCR5 d32 polymorphism with systemic inflammatory response, extra-articular symptoms and joint erosion in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 11: R91.

Salanga CL, O'Hayre M and Handel T (2009). Modulation of chemokine receptor activity through dimerization and crosstalk. *Cell Mol Life Sci* 66: 1370-1386.

Sallusto F and Lanzavecchia A (2000). Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 177: 134-140.

Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G and Parmentier M (1996). Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* 35: 3362-3367.

Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, *et al.* (1996). Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382: 722-725.

Samson M, Soularue P, Vassart G and Parmentier M (1996). The genes encoding the human CC-chemokine receptors CC-CKR1 to CC-CKR5 (CMKBR1-CMKBR5) are clustered in the p21.3-p24 region of chromosome 3. *Genomics* 36: 522-526.

Sandrin-Garcia P, Brandao LA, Coelho AV, Guimaraes RL, Pancoto JA, Segat L, Donadi EA, de Lima-Filho JL and Crovella S Mannose binding lectin gene (MBL2) functional polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in southern Brazilians. *Hum Immunol* 72: 516-521.

Scheibel I, Veit T, Neves AG, Souza L, Prezzi S, Machado S, Kohem C, Icarelli M, Xavier R, Brenol JC, *et al.* (2008). Differential CCR5Delta32 allelic frequencies in juvenile idiopathic arthritis subtypes: evidence for different regulatory roles of CCR5 in rheumatological diseases. *Scand J Rheumatol* 37: 13-17.

Scheibel I, Veit T, Neves aG, Souza L, Prezzi S, Machado S, Kohem C, Icarelli M, Xavier R, Brenol JC, *et al.* (2008). Differential CCR5Delta32 allelic frequencies in juvenile idiopathic arthritis subtypes: evidence for different regulatory roles of CCR5 in rheumatological diseases. *Scandinavian journal of rheumatology* 37: 13-17.

Schiffer L, Kumpers P, Davalos-Misslitz AM, Haubitz M, Haller H, Anders HJ, Witte T and Schiffer M (2009). B-cell-attracting chemokine CXCL13 as a marker of disease activity and renal involvement in systemic lupus erythematosus (SLE). *Nephrol Dial Transplant* 24: 3708-3712.

Schwartzman-Morris J and Putterman C Gender differences in the pathogenesis and outcome of lupus and of lupus nephritis. *Clin Dev Immunol* 2012: 604892.

Sekigawa I, Nawata M, Seta N, Yamada M, Iida N and Hashimoto H (2002). Cytomegalovirus infection in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 20: 559-564.

Setoguchi R, Hori S, Takahashi T and Sakaguchi S (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 201: 723-735.

Shao W-H and Cohen PL (2011). Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy* 13: 202.

Shao WH and Cohen PL (2011). Disturbances of apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 13: 202.

Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Kaslow R, *et al.* (1997). Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science* 277: 959-965.

Springer TA (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314.

Stasikowska O, Danilewicz M and Wagrowska-Danilewicz M (2007). The significant role of CCL5 and CCR5 in progressive tubulointerstitial lesions in lupus nephropathy. *Pol J Pathol* 58: 35-40.

Steinmetz OM, Turner JE, Paust HJ, Lindner M, Peters A, Heiss K, Velden J, Hopfer H, Fehr S, Krieger T, *et al.* (2009). CXCR3 mediates renal Th1 and Th17 immune response in murine lupus nephritis. *J Immunol* 183: 4693-4704.

Symmons DP, Coppock JS, Bacon PA, Bresnihan B, Isenberg DA, Maddison P, McHugh N, Snaith ML and Zoma AS (1988). Development and assessment of a computerized index of clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. Members of the British Isles Lupus Assessment Group (BILAG). *Q J Med* 69: 927-937.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N and Winchester RJ (1982). The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25: 1271-1277.

Tian S, Li J, Wang L, Liu T, Liu H, Cheng G, Liu D, Deng Y, Gou R, Wan Y, *et al.* (2007). Urinary levels of CCL5 and M-CSF are predictors of lupus nephritis flare. *Inflamm Res* 56: 304-310.

Toussiot E and Roudier J (2008). Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22: 883-896.

Truedsson L, Bengtsson AA and Sturfelt G (2007). Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 40: 560-566.

Tsokos GC (2011). Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 365: 2110-2121.

Turner JE, Paust HJ, Bennstein SB, Bramke P, Krebs C, Steinmetz OM, Velden J, Haag F, Stahl RA and Panzer U (2012). Protective role for CCR5 in murine lupus nephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 302: F1503-1515.

Turner JE, Paust HJ, Steinmetz OM, Peters A, Meyer-Schwesinger C, Heymann F, Helmchen U, Fehr S, Horuk R, Wenzel U, *et al.* (2008). CCR5 deficiency aggravates crescentic glomerulonephritis in mice. *J Immunol* 181: 6546-6556.

Vargas aE, da Silva MaL, Silla L and Chies JaB (2005). Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease. *Tissue antigens* 66: 683-690.

Vila LM, Molina MJ, Mayor AM, Cruz JJ, Rios-Olivares E and Rios Z (2007). Association of serum MIP-1alpha, MIP-1beta, and CCL5 with clinical manifestations, disease activity, and damage accrual in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 26: 718-722.

Vilar MJ and Sato EI (2002). Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus* 11: 528-532.

Vitali C, Bencivelli W, Isenberg DA, Smolen JS, Snaith ML, Sciuto M, Neri R and Bombardieri S (1992). Disease activity in systemic lupus erythematosus: report of the Consensus Study Group of the European Workshop for Rheumatology Research. II. Identification of the variables indicative of disease activity and their use in the development of an activity score. The European Consensus Study Group for Disease Activity in SLE. *Clin Exp Rheumatol* 10: 541-547.

Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR and Girkontaite I (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390: 350-351.

Wadee S, Tikly M and Hopley M (2007). Causes and predictors of death in South Africans with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 46: 1487-1491.

Walport MJ (2001). Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344: 1058-1066.

Wang A, Fairhurst AM, Tus K, Subramanian S, Liu Y, Lin F, Igarashi P, Zhou XJ, Batteux F, Wong D, *et al.* (2009). CXCR4/CXCL12 hyperexpression plays a pivotal role in the pathogenesis of lupus. *J Immunol* 182: 4448-4458.

Wang A, Guilpain P, Chong BF, Chouzenoux S, Guillevin L, Du Y, Zhou XJ, Lin F, Fairhurst AM, Boudreaux C, *et al.* (2010). Dysregulated expression of CXCR4/CXCL12 in subsets of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 62: 3436-3446.

Weening JJ (2004). The Classification of Glomerulonephritis in Systemic Lupus Erythematosus Revisited. *Journal of the American Society of Nephrology* 15: 241-250.

Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Wong PT and Lam CW (2008). Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clin Immunol* 127: 385-393.

Wong CK, Wong PT, Tam LS, Li EK, Chen DP and Lam CW (2010). Elevated production of B cell chemokine CXCL13 is correlated with systemic lupus erythematosus disease activity. *J Clin Immunol* 30: 45-52.

Wong LM, Myers SJ, Tsou CL, Gosling J, Arai H and Charo IF (1997). Organization and differential expression of the human monocyte chemoattractant protein 1 receptor gene. Evidence for the role of the carboxyl-terminal tail in receptor trafficking. *J Biol Chem* 272: 1038-1045.

Xie C, Liu K, Fu Y, Qin X, Jonnala G, Wang T, Wang HW, Maldonado M, Zhou XJ and Mohan C (2011). CCL5 deficiency attenuates autoantibody-induced glomerulonephritis. *J Clin Immunol* 31: 128-135.

Xu WD, Peng H, Zhou M, Zhang M, Li BZ, Pan HF and Ye DQ (2013). Association of CCL5 and MBL gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 40: 941-948.

Yamagami S, Tokuda Y, Ishii K, Tanaka H and Endo N (1994). cDNA cloning and functional expression of a human monocyte chemoattractant protein 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 1156-1162.

Yu SL, Kuan WP, Wong CK, Li EK and Tam LS (2012). Immunopathological roles of cytokines, chemokines, signaling molecules, and pattern-recognition receptors in systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol* 2012: 715190.

Zhao X, Tang Y, Qu B, Cui H, Wang S, Wang L, Luo X, Huang X, Li J, Chen S, *et al.* (2010). MicroRNA-125a contributes to elevated inflammatory chemokine CCL5 levels via targeting KLF13 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 62: 3425-3435.

Zimmerman PA, Buckler-White A, Alkhatib G, Spalding T, Kubofcik J, Combadiere C, Weissman D, Cohen O, Rubbert A, Lam G, *et al.* (1997). Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol Med* 3: 23-36.

Zipfel PF and Skerka C (2009). Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* 9: 729-740.

## ANEXO 1

CrITÉRIOS de ClassificaÇão Revisados de 1982 do *American College of Rheumatology* (ACR) (Tan, 1982), revisados em 1997(Hochberg, 1997), tabela modificada.

CrITÉRIOS	DefiniÇão
<b>Eritema malar</b>	Eritema fixo, achatado ou elevado sobre a regiãO malar.
<b>Eritema discóide</b>	Placas eritematosas em relevo com descamaÇão ceratÓtica aderente e rolhas cÓrneas foliculares; cicatrizes atrÓficas podem ocorrer.
<b>Fotossensibilidade</b>	ErupÇão cutânea resultante da exposiÇão a raios UV por histÓrico do paciente ou observaÇão do mÉdico.
<b>Úlceras orais</b>	UlceraÇão oral ou nasofaríngea, geralmente sem dor, verificada por mÉdicos.
<b>Artrite</b>	Artrite nãO-erosiva envolvendo duas ou mais articulaÇões perifÉricas, caracterizadas por sensibilidade, inchaço ou derrame.
<b>Serosite</b>	Pleurite – histÓrico convincente de dor pleurÍtica ou atrito escutado por mÉdico, ou evidências de derrame pleural; ou Pericardite – documentada por eletrocardiograma ou atrito, ou por evidência de derrame pericárdico.
<b>Doença renal</b>	Proteinúria persistente >0,5g/dl ou >3+ se quantificaÇão nãO for realizada; ou Cilindros celulares – podem ser célula vermelha do sangue, hemoglobina, granular, tubular ou mista.
<b>Doença neurolÓgica</b>	Convulsões – na ausênciA de medicamentos agressores ou disfunções conhecidas do metabolismo, p. ex., uremia, cetoacidose, desequilÍbrio eletrolÍtico; ou Psicose – na ausênciA de medicamentos agressores ou disfunções conhecidas do metabolismo, p. ex., uremia, cetoacidose, desequilÍbrio eletrolÍtico.
<b>Doença hematolÓgica</b>	Anemia hemolÍtica – com reticulocitose; ou Leucopenia - <4,0 x 10 <sup>9</sup> /L (4.000/ $\mu$ l) total em duas ou mais ocasiões; ou Linfopenia - <1,5 x 10 <sup>9</sup> /L (1.500/ $\mu$ l) em duas ou mais ocasiões; ou Trombocitopenia - <100 x 10 <sup>9</sup> /L (100 x 10 <sup>9</sup> / $\mu$ l) na ausênciA de medicamentos agressores.
<b>Doença imunolÓgica</b>	Anticorpos contra o DNA nativo em tÍtulos anormais; Presença de anticorpos contra antÍgeno nuclear anti-Sm; Presença de anticorpos anti-fosfolípídeos baseados em: NÍveis sorolÓgicos anormais de anticorpos anti-cardiolipina IgG ou IgM; Resultado positivo para teste de anticoagulante lúpico, utilizando um método padrãO; Testes sorolÓgicos falso positivos para Sífilis, positivos por pelo menos 6 meses confirmados pela imobilizaÇão do <i>Treponema pallidum</i> ou teste de absorÇão por anticorpos treponêmicos fluorescentes.
<b>Anticorpo anti-nuclear</b>	Titulações anormais de anticorpos anti-nucleares por imunofluorescência ou ensaio equivalente, a qualquer momento e na ausênciA de medicamentos conhecidos de associaÇão com a síndrome de lúpus induzido por medicamentos.

## ANEXO 2

Critérios clínicos e imunológicos utilizados no sistema de classificação do SLICC (Petri, 2012), tabela modificada.

Critérios clínicos
<b>1. Lúpus cutâneo agudo, incluindo:</b> Eritema malar; Lúpus bolhoso; Necrose epidermal tóxica variante do LES; Eritema maculopapular; Eritema fotossensitivo; na presença de dermatomiosite, OU Lúpus subcutâneo agudo.
<b>2. Lúpus cutâneo crônico, incluindo:</b> Eritema discoide clássico (localizado ou generalizado); Lúpus hipertrófico; Paniculite lúpica; Lúpus de mucosa oral; Lúpus eritematoso túmido; Frieiras geradas por lúpus Lúpus discoide (líquens planos sobrepostos)
<b>3. Úlceras orais</b> Palato (bucais ou na língua) OU úlceras nasais (na ausência de outras causas).
<b>4. Alopecia sem cicatrizes (afinamento e fragilidade dos fios, na ausência de outros fatores)</b>
<b>5. Sinovite envolvendo 2 ou mais articulações, caracterizada por inchaço ou derrames; OU sensibilidade em 2 ou mais articulações e pelo menos 30 minutos de rigidez matinal.</b>
<b>6. Serosite</b> Pleurisia típica por mais de 1 dia OU derrames pleurais; OU coceiras pleurais; Dor típica no pericárdio por mais de 1 dia OU derrame no pericárdio; OU coceira no pericárdio; OU pericardite por eletrocardiografia; na ausência de outras causas.
<b>7. Envolvimento renal:</b> Razão de proteína/creatinina na urina representando 500mg de proteína/24horas; OU "casts" de eritrócitos.
<b>8. Envolvimento neurológico</b> Convulsões Psicose; Mononeurite múltipla (na ausência de outra causa); Mielite Neuropatia periférica ou craniana (na ausência de outra causa); Estado de confusão agudo (na ausência de outra causa);
<b>9. Anemia hemolítica</b>
<b>10. Leucopenia (&lt;4.000mm<sup>3</sup> pelo menos uma vez); OU linfopenia (&lt;1.000mm<sup>3</sup> pelo menos uma vez).</b>
<b>11. Trombocitopenia (&lt;100.000mm<sup>3</sup> pelo menos uma vez, na ausência de outra causa).</b>
Critérios Imunológicos
<b>1. Níveis de anticorpo antinuclear acima dos valores de referência;</b>
<b>2. Níveis de anticorpo anti-DNA dupla fita acima dos valores de referência (ou maior que 2 vezes o valor de referência se testado por ELISA);</b>



**3. Presença de anticorpo contra antígeno nuclear Sm ;**

**4. Positividade para anticorpo antifosfolípido determinada por qualquer um dos itens a seguir:**

**Resultado positivo para anticoagulante lúpico;**

**Resultado falso positivo no teste rápido de reagina do plasma;**

**Níveis de anticorpo anticardiolipina médios ou altos (IgA, IgG ou IgM);**

**Resultado positivo para o teste anti-β2-glicoproteína I (IgA, IgG ou IgM).**

**5. Complemento baixo;**

**C3 baixo;**

**C4 baixo;**

**CH50 baixo.**

**6. Teste direto de Coombs na ausência de anemia hemolítica.**