

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

VANESSA GARCIA GERMOGLIO

**Gene *Semaforina 4A* (*SEMA4A*): Estudo de associação com
susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico e suas
manifestações clínicas**

Recife

2014

Vanessa Garcia Germoglio

Gene *Semaforina 4A* (*SEMA4A*): Estudo de associação com susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico e suas manifestações clínicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Paula Sandrin Garcia

**Recife
2014**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Germoglio, Vanessa Garcia

Gene *Semaforina 4A* (SEMA4A): estudo de associação com susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico e suas manifestações clínicas/ Recife: O Autor, 2014.

56 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Paula Sandrin Garcia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2014.

Inclui bibliografia

- 1. Lúpus Eritematoso Sistêmico 2. Expressão gênica I. Garcia, Paula Sandrin (orientadora) II. Título**

616.772

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2014- 164

Vanessa Garcia Germoglio

Título do Trabalho

Aprovado em 13/03/2014

Banca Examinadora:

Dr^a. Paula Sandrin-Garcia
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Mônica Lúcia Adam
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Jaqueline de Azevêdo Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Recife
2014

Dedico este trabalho aos meus pais pelo apoio e incentivo irrestritos. E a todos aqueles que não me deixaram esmorecer nessa minha caminhada.

Agradecimentos

A Deus por ter me dado a alegria de viver esse sonho e, principalmente, pela força concedida para que assim eu o concluísse. Agradeço ainda, e infinitamente, pelas pessoas que Ele colocou ao meu redor me inspirando coragem.

Aos meus pais pela presença em cada degrau galgado até o momento. Painho, obrigada por vibrar junto a mim em cada vitória. Mainha, obrigada por ser a minha força quando a minha própria não se torna presente.

Ao meu noivo por todo carinho e atenção oferecidos. Obrigada, meu amor pelos momentos de serenidade que você me proporcionou nos obstáculos dessa caminhada.

À minha orientadora, Paula Sandrin Garcia, pela paciência, incentivo e, principalmente, por não desistir de mim. Obrigada pela orientação e pelo apoio que tornaram possível a conclusão deste desafio.

À Jaqueline toda a minha gratidão. Muito obrigada por toda a ajuda oferecida em cada momento do curso, particularmente no momento mais crítico. Seu comprometimento comigo me fez acreditar em mim novamente.

Aos amigos do laboratório que se fizeram presentes sempre que precisei. Sem vocês eu não teria conseguido. Cada um, de algum modo, foi responsável por essa vitória. Muito obrigada.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim, fazendo a vida valer cada vez mais a pena.

E por fim, à FACEPE por ter financiado este trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

Resumo

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune que afeta diversos órgãos e sistemas. Embora os fatores que contribuem para a patogenia da doença não estejam totalmente esclarecidos, sabe-se que o LES é um distúrbio multifatorial que envolve a ativação de células B e T autorreativas contra uma variedade de componentes intracelulares. A proteína Semaforina 4A (Sema4A) é preferencialmente expressa em células dendríticas, B e T e está envolvida na ativação de células T, regulando a resposta imune mediada por essas células, podendo dessa forma estar envolvida no desencadeamento da doença. O presente estudo investigou a associação dos polimorfismos de base única (SNPs) rs7695 [C>T], rs3738582 [C>G], rs12401573 [C>T] e rs3738581 [C>T] com a susceptibilidade ao LES e às suas manifestações clínicas. O grupo amostral foi constituído por duas populações brasileiras com LES, sendo 158 pacientes e 189 controles provenientes do Sudeste, e 122 pacientes e 159 controles provenientes do Nordeste. As análises estatísticas e o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) foram realizadas através dos programas *SNPStats* e R 2.15.0. Todos os grupos analisados estavam em equilíbrio de HW. O SNP rs3738581 (C>T) foi associado à doença nas duas populações estudadas com todos os genótipos conferindo susceptibilidade ao LES (Sudeste: T/T OR = 3,60 e C/T OR = 2,36; Nordeste: T/T OR = 13,17 e C/T OR = 2,12). Em relação às manifestações clínicas, na população do Sudeste foi observada associação entre alterações neurológicas em 3 dos SNPs testados (rs7696, rs12401573 e rs3738581); e ainda SAAF (rs7695) e alterações hematológicas (rs3738581). Na população do Nordeste foram observadas associações entre úlceras orais (rs7696) e “rash” malar (rs12401573). Todas as associações foram estatisticamente significantes após a correção de Bonferroni ($p\text{-value} < 0,0125$). Esse é o primeiro estudo relatando associação do gene *SEMA4A* e a susceptibilidade ao LES, envolvendo uma das principais características responsáveis pela mortalidade dos pacientes, que são as alterações neurológicas.

Palavras-chave: Lúpus Eritematoso Sistêmico; SNPs; *SEMA4A*

Abstract

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease that affects several organs and systems. Although the factors that contribute to the pathogenesis of the disease are not fully understood, it is known that SLE is a multifactorial disorder that involves the activation of autoreactive B and T cells against a variety of intracellular components. The protein Semaphorin 4A (Sema4A) is preferentially expressed on dendritic cells, B and T and is involved in T cell activation, regulating the immune response mediated by these cells, and may thus be involved in triggering the disease. The present study investigated the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs7695 [C> T], rs3738582 [C> G], rs12401573 [C> T] and rs3738581 [C> T] with susceptibility to SLE and its manifestations clinics. The sample group consisted of two Brazilian populations with SLE, 158 patients and 189 controls from the Southeast, and 122 patients and 159 controls from the Northeast. The statistical analyzes and Hardy-Weinberg (HW) were performed through SNPStats and R 2.15.0 programs. All groups were in HW equilibrium. The SNP rs3738581 (C>T) was associated with the disease in the populations studied with all genotypes conferring susceptibility to SLE (Southeast: T/T OR = 3.60 e C/T OR = 2.36; Northeast: T/T OR = 13.17 e C/T OR = 2.12). Regarding types of clinical manifestations in the Southeast population association was observed between neurological disorders in 3 of the tested SNPs (rs7696, rs12401573 and rs3738581) and still SAAF (rs7695) and hematological (rs3738581). In the Northeast population associations between oral ulcers (rs7695) and malar rash (rs12401573) were observed. All associations were statistically significant after Bonferroni correction (p-value <0.0125). This is the first study reporting the association SEMA4A gene and susceptibility to SLE, involving also a major clinical feature responsible for the mortality of patients that are neurological alterations.

Key words: Systemic Lupus Erythematosus; SNPs; *SEMA4A*

Lista de Ilustrações

Figura 1. Visão geral da patogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico. O esquema ilustra a atuação dos fatores envolvidos na etiopatogênese do LES e a interação com os componentes do sistema imune, resultando no dano à órgãos e tecidos característica da doença. Adaptado de Tsokos (2011).....	6
Figura 2. Mecanismo geral dos distúrbios de apoptose e desregulação na remoção de células apoptóticas, culminando na deposição de imunocomplexos. Adaptado de Tiffin <i>et al.</i> (2013).....	10
Figura 3. Esquema demonstrativo do estabelecimento do LES, seus fatores associados e suas fases. Adaptado de Tiffin <i>et al.</i> (2013).....	13
Figura 4. Manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com LES e os diferentes órgãos e sistemas envolvidos (Fonte: misodor.com/LUPUS.html).....	14
Quadro 1. Critérios para o diagnóstico do Lúpus Eritematoso Sistêmico de acordo com o ACR. Adaptado de Tsokos (2011).....	15
Figura 5. “Rash” malar ou lesão em asa de borboleta – frequente nos pacientes com LES. Fonte: Uva <i>et al.</i> (2012).....	16
Figura 6. Genes associados ao desenvolvimento do LES com suas respectivas localizações cromossômicas e funções. Adaptado de Tsokos (2011).....	23
Figura 7. Estrutura da família das semaforinas. As proteínas podem ser ligadas à membrana ou solúveis, mas todas possuem o domínio sema. Adaptado de Kumanogoh & Kikutani (2003).....	24
Figura 8. Envolvimento do Sema4A na ativação de célula T através do Tim-2. Adaptado de Kumanogoh & Kikutani (2003).....	27

Figura 9. Localização cromossômica indicada pela seta amarela e descrição do gene SEMA4A com seus 15 éxons representados. Adaptado de SNPBrowser 4.0.....	27
Figura 10. Posição dos SNPs e a área que eles representam no gene. Adaptado de SNPbrowser 4.0.....	33
Figura 11. Posição no gene dos SNPs analisados e o desequilíbrio de ligação entre eles. A) População do Nordeste $D' = 100$. B) População do Sudeste $D' = 97$	41

Lista de Tabelas

Tabela 1. Descrição das características clínicas dos pacientes com LES do Sudeste brasileiro.....	31
Tabela 2. Descrição das características clínicas dos pacientes com LES do Nordeste brasileiro.....	32
Tabela 3. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do gene <i>SEMA4A</i> nos pacientes e controles do Sudeste analisados.....	36
Tabela 4. Distribuição das frequências alélicas e genotípicas do gene <i>SEMA4A</i> nos pacientes e controles do Nordeste analisados.....	37
Tabela 5. Manifestações clínicas associadas ao gene <i>SEMA4A</i> nas populações do Sudeste e Nordeste Brasileiros.....	38
Tabela 6. Análise de associação das manifestações clínicas dos pacientes com LES do Sudeste em relação ao sexo e etnia.....	39
Tabela 7. Análise de associação das manifestações clínicas dos pacientes com LES do Nordeste em relação ao sexo e etnia.....	40

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
ACR	Colégio Americano de Reumatologia
ANA	Anticorpo anti-nuclear
anti-Sm	Anticorpo anti-Smith
APC	Célula apresentadora de antígeno
CD	Célula dendrítica
CORD10	Distrofia dos cones e bastonetes do tipo 10
CR 1	Receptor do complemento 1
CTLA4	Antígeno de linfócito T citotóxico 4
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
EAM	Miocardite autoimune experimental
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol
GWAS	Estudo de associação genômica em larga escala
HLA	Complexo de histocompatibilidade humana
HW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IC	Intervalo de confiança
IFN I	Interferon do tipo I
IL-17	Interleucina 17
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IRF5	Fator regulador de Interferon 5
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
MAF	Frequência alélica mínima
mRNA	RNA mensageiro
OR	Odds Ratio
PTPN22	Proteína tirosina fosfatase não-receptor tipo 22
RP35	Retinite pigmentosa tipo 35
SAAF	Síndrome do anticorpo antifosfolípido
<i>SEMA4A</i>	Semaforina 4A (gene)

Sema4A	Semaforina 4A (proteína)
SNP	Polimorfismo de base única
TCR	Receptor de célula T
Th	Célula T helper
Tim-2	Domínio de mucina e imunoglobulina de célula T-2
TNF α	Fator de necrose tumoral α
Treg	Célula T reguladora
UTR	Região não-traduzida

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico	3
2.1.1 Epidemiologia	3
2.1.2 Patogênese do LES	5
2.1.3 Alterações Imunológicas no LES	7
2.1.4 Manifestações Clínicas	13
2.2 A Genética do LES	19
2.2.1 Gene Semaforina 4A	23
3. Objetivos	29
3.1 Geral	29
3.2 Específicos	29
4. Material e Métodos	30
4.1 Amostras	30
4.1.1 População 1: Sudeste	30
4.1.2 População 2: Nordeste	31
4.1.3 Extração de DNA	32
4.2 Seleção dos SNPs e Genotipagem	33
4.3 Análises de Dados	34
5. Resultados	35
5.1 Associação dos SNPs no Gene SEMA4A e a Susceptibilidade ao LES	35
5.2 SNPs no Gene SEMA4A x Manifestações Clínicas do LES	38
5.3 Haplótipos	41
6. Discussão	42
7. Conclusões	46
8. Referências Bibliográficas	47
9. Curriculum vitae (Lattes)	53

1. Introdução

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença crônica autoimune de etiologia desconhecida e patogênese multifatorial. Vários fatores estão implicados no desencadeamento da doença como genéticos, ambientais, imunológicos e hormonais, resultando em manifestações clínicas heterogêneas que afetam diversos tecidos ou órgãos do paciente. O diagnóstico do LES é baseado em 11 critérios clínicos e imunológicos, estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR). De acordo com o ACR para que o diagnóstico da doença seja confirmado ao menos quatro deles precisam estar presentes, simultaneamente no indivíduo.

As semaforinas foram primeiramente descritas em células do sistema nervoso e estão envolvidas na orientação de axônios durante o desenvolvimento desse sistema. Essas proteínas também estão envolvidas na organogênese, vascularização, angiogênese e progressão do câncer. No sistema imune, as semaforinas são conhecidas como semaforinas imunes, desempenhando um papel crucial na regulação da resposta imune através de células dendríticas.

Entre as semaforinas imunes, a Semaforina 4A (Sema4A) é expressa constitutivamente em células dendríticas e em células B não ativadas, mas não apresenta expressão em células T não ativadas. Sema4A está envolvida na ativação e diferenciação de células T, regulando a resposta imune mediada por essas células através da interação com seu receptor Tim-2 (*T-cell, immunoglobulin and mucin domain protein 2*). Apesar do crescente número de estudos sobre o envolvimento das semaforinas no sistema imunológico, pouco é conhecido sobre sua participação em doenças autoimunes. No LES, há uma

desregulação imunológica geral causada pela quebra da autotolerância nas células B e T, bem como defeitos na remoção de corpos apoptóticos e ativação inadequada de APCs.

Polimorfismos de base única (SNPs) são a maior fonte de variações genéticas interindividuais e estão sendo utilizados como uma extraordinária ferramenta na análise de marcadores genéticos para identificar polimorfismos gênicos na predisposição a uma gama de doenças genéticas, principalmente doenças multifatoriais. Dessa forma, pesquisas com o intuito de detectar polimorfismos em genes candidatos, como o *SEMA4A* no LES, poderão contribuir significativamente para a compreensão do processo de desenvolvimento da doença.

Em estudo anterior, o gene *SEMA4A* mostrou-se diferencialmente expresso nos pacientes com LES, com expressão 32 vezes maior do que a observada nos controles, sugerindo que SNPs neste gene poderiam alterar, de alguma forma, a proteína produzida, levando a uma resposta imune mediada por células T exacerbada com participação na quebra e manutenção da autotolerância presente no LES.

A literatura no que se refere às consequências das alterações no gene *SEMA4A* ainda é escassa e sua participação em doenças autoimunes nunca foi investigada. Desta forma, até o momento, não foram realizados estudos investigando o gene *SEMA4A* na patogênese do LES, tornando o presente estudo o primeiro a relacionar polimorfismos de base única (SNPs) neste gene com a susceptibilidade ao lúpus.

2. Revisão da Literatura

2.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico

2.1.1 Epidemiologia

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune subdiagnosticada, o que dificulta a coleta de dados mais precisos no que diz respeito às suas taxas de incidência e prevalência em todo o mundo (Borchers, *et al.*, 2010). A prevalência mundial do LES pode variar entre 20 a 150 casos a cada 100.000 pessoas (Tsokos, 2011), enquanto a incidência varia aproximadamente de 1 a 10 novos casos a cada 100.000 pessoas por ano (Kandala *et al.*, 2013).

O LES apresenta taxas de prevalência e incidência variadas em diferentes regiões do mundo devido, principalmente, às variações nos fatores genéticos, populacionais e ambientais (Vilar & Sato, 2002; Kyttaris, 2010). A incidência da doença na Dinamarca é de 1 caso a cada 100.000 indivíduos, enquanto sua prevalência é de 28,3 casos a cada 100.000 (Fortuna & Brennan, 2013). Na Rússia, as taxas de prevalência e incidência no LES são de 9 casos em 100.000 e 1,4 novo caso a cada 100.000 pessoas por ano, respectivamente (Nasonov *et al.*, 2014). A prevalência e a incidência do LES no Reino Unido são, respectivamente, 25 em cada 100.000 pessoas e 9 novos casos a cada 100.000 pessoas (Tiffin *et al.*, 2013). Na China, um estudo recente estimou a prevalência da doença em 37,56 casos a cada 100.000 pessoas (Zou *et al.*, 2013).

Estudos epidemiológicos realizados no Brasil, onde há uma grande miscigenação racial e diferentes condições climáticas, mostraram como as taxas de incidência da doença podem diferir entre regiões de um mesmo país. O

primeiro estudo foi realizado no Nordeste brasileiro, na cidade de Natal, no Rio Grande do Norte, por Vilar & Sato (2002), o qual indicou uma incidência anual de 8,7 a cada 100.000 pessoas, com uma frequência maior em mulheres (14,1: 2,2). O segundo estudo realizado foi no Sul do Brasil, em Cascavel, no Paraná, por Nakashima *et al.* (2011) mostrou uma incidência de 4,8 casos por 100.000 habitantes/ano. Essa divergência presente nas incidências entre as cidades estudadas pode ser explicada pela localização geográfica de Natal, pois essa cidade recebe altas taxas de raios ultravioletas, bem como pela formação étnica das regiões estudadas, uma vez que a porcentagem de pardos e negros em Natal é superior ao percentual da cidade de Cascavel (Vilar & Sato, 2002; Nakashima *et al.*, 2011).

Estudos étnicos mostram que os indivíduos com descendência caucasiana são menos afetados pela doença (Danchenko *et al.*, 2006). Isso pode ser observado entre diferentes etnias com descendentes africanos, hispânicos ou asiáticos, os quais são cerca de três vezes mais acometidos pelo LES quando comparadas com populações caucasianas (Pons-Estel *et al.*, 2010). Além do que, indivíduos afrodescendentes acometidos pelo LES apresentam pior evolução da doença e, conseqüentemente, menor sobrevida em relação aos indivíduos caucasianos (Lockshin, 2008).

O LES afeta predominantemente mulheres em idade reprodutiva, entre 25 e 44 anos (Danchenko *et al.*, 2006), com uma taxa que varia de 6 a 14 mulheres afetadas para cada homem afetado (Jakes *et al.*, 2012). A doença também pode ocorrer na infância e na senescência. Entretanto, a taxa de incidência do LES infantil na Europa e na América do Norte, em crianças menores de 16 anos, é menor que 1 a cada 100.000 pessoas (Huemer *et al.*, 2001). Diferente da fase

adulta, a incidência/prevalência do LES juvenil e em idosos não apresenta diferenças tão contrastantes entre os sexos, o que corrobora a influência dos fatores hormonais no desenvolvimento da doença (Kyttaris, 2010).

2.1.2 Patogênese do LES

As doenças autoimunes são caracterizadas por uma resposta inflamatória inadequada e alterada com conseqüente comprometimento de tecidos e órgãos, no qual o sistema imune não é capaz de diferenciar o próprio do não próprio (Zenewicz *et al.*, 2010). Segundo Abbas *et al.* (2008), tais distúrbios são definidos pela perda da capacidade de autotolerância do sistema imunológico, ou seja, alterações no processo da autotolerância levam à respostas imunológicas dirigidas contra antígenos autólogos que podem resultar nas doenças autoimunes.

A autotolerância pode ser dividida em tolerância central e periférica. A tolerância central assegura que linfócitos imaturos presentes nos órgãos linfoides primários, como a medula óssea para as células B e o timo para as células T, reconheçam antígenos próprios, sendo que tal reconhecimento pode provocar: morte por apoptose; edição de receptor em células B imaturas; ou diferenciação de células T CD4⁺ em células T reguladoras (Treg). A tolerância periférica promove a eliminação ou desativação de linfócitos maduros por anergia, deleção ou supressão, quando essas células reconhecem antígenos próprios nos tecidos periféricos (Abbas *et al.*, 2008).

Além da perda da autotolerância, a patogênese de doenças autoimunes também envolve a ativação inadequada de células apresentadoras de antígenos (APCs), fazendo com que essas células sejam ativadas de modo a apresentar os antígenos próprios ao sistema imunológico de forma imunogênica, levando a uma

casca de reações que culmina na produção de autoanticorpos por células B autorreativas provocando o dano tecidual (Abbas *et al.*, 2008).

O LES é conhecido por ser o protótipo mais completo de uma doença autoimune, justamente por envolver alterações em todos os níveis da resposta imune e suas células. Sendo assim, alterações nas células do sistema imune, bem como nos produtos secretados pelas mesmas, como citocinas e autoanticorpos, fazem do organismo do indivíduo afetado pelo LES, um ambiente propício para que a patologia tenha início (Zenewicz *et al.*, 2010; Tsokos, 2011).

A patogênese do LES é complexa e abrange todo o sistema imunológico, o qual apresenta desregulação devido à diversos fatores que alteram células e proteínas do sistema imune, levando ao dano tecidual, como mostra a figura 1 (Yu *et al.*, 2012).

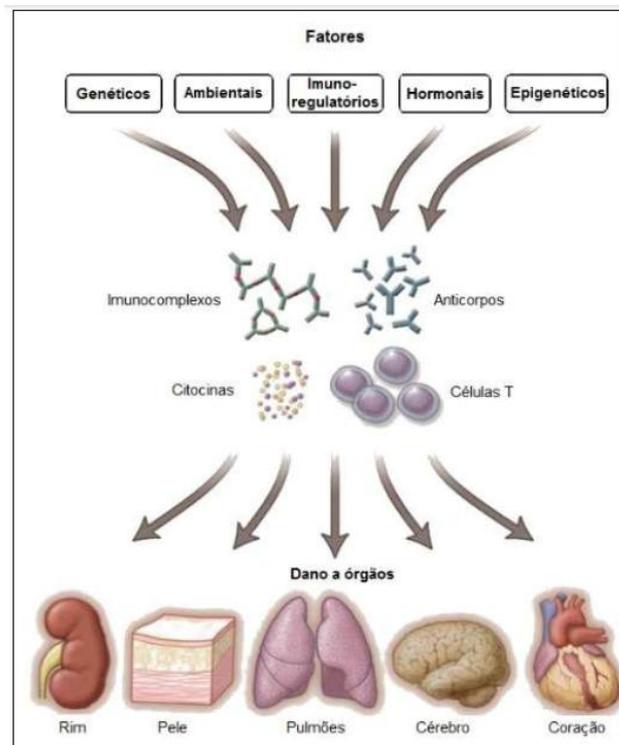


Figura 1. Visão geral da patogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico. O esquema ilustra a atuação dos fatores envolvidos na etiopatogênese do LES e a interação com os componentes do sistema imune, resultando no dano à órgãos e tecidos característica da doença. Adaptado de Tsokos (2011).

2.1.3 Alterações Imunológicas no LES

As citocinas são proteínas secretadas pelas células do sistema imunológico e podem ter efeitos tanto estimulatórios, participando da proliferação, ativação e quimiotaxia, quanto supressores, favorecendo a diminuição de respostas imunes indesejadas ou inadequadas. Dessa forma, alterações nessas proteínas têm sido implicadas na patogênese do LES, uma vez que elas exercem papel importante na modulação da resposta imunológica (Apostolidis *et al.*, 2011).

A Interleucina-2 (IL-2) é secretada por células T e desempenha funções imunorreguladoras importantes sobre essas células. No LES, há uma diminuição na produção dessa citocina (Alcocer-Varela & Alarcón-Segovia, 1982), o que pode contribuir para a redução do número de células T reguladoras (Tregs), uma vez que a IL-2 é necessária para a sobrevivência e funcionamento dessas células (Lieberman & Tsokos, 2010). Níveis reduzidos de IL-2 também resultam em baixa atividade de células T citotóxicas, aumentando o risco de infecção em pacientes debilitados pela doença. Por fim, a deficiência de IL-2 no LES implica na supressão do mecanismo de morte celular induzida por ativação, e consequente aumento da longevidade de células T autorreativas (Tsokos, 2011).

A Interleucina-17 (IL-17) é produzida principalmente por células T e é importante elo entre a imunidade adaptativa mediada por células T e os componentes inflamatórios da imunidade inata, desempenhando papel essencial na resposta imune contra certas bactérias e fungos (Abbas *et al.*, 2008). As células produtoras de IL-17, células Th17, têm sido implicadas na patogênese de várias doenças autoimunes, incluindo o LES. O soro de indivíduos com a doença contém níveis anormalmente elevados dessa citocina e, tais pacientes, também secretam a IL-17 através de células T CD4⁺ e CD4⁻CD8⁻ (duplo negativas)

(Nalbandian *et al.*, 2009; Crispín *et al.*, 2010). Pacientes com nefrite lúpica, umas das manifestações clínicas mais recorrentes nesses indivíduos, apresentam células secretoras de IL-17 em infiltrados nos rins. O aumento da produção de IL-17 está correlacionado com a atividade da doença, isto é, a liberação dessa citocina amplifica a resposta inflamatória, recrutando células efetoras aos órgãos alvos (Yang *et al.*, 2009).

O Interferon tipo I (IFN α e IFN β) participa de várias funções, como antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora. Devido a isso, essa citocina foi relacionada com o processo patogênico de diversas doenças autoimunes, incluindo o LES (Apostolidis *et al.*, 2011). Estudos avaliando os níveis séricos de IFN I em pacientes com LES mostraram que tanto os pacientes quanto os indivíduos saudáveis de uma mesma família têm produção elevada de IFN α (Niewold *et al.*, 2007; 2008). Isso indica que o controle genético do IFN I é significativo para a susceptibilidade à doença. Entretanto para o desenvolvimento das manifestações clínicas, são requeridas associações com outros fatores como, por exemplo, polimorfismos genéticos em outros genes, fatores ambientais e hormonais (Apostolidis *et al.*, 2011). Além disso, um estudo de análise de expressão gênica de IFN I mostrou que 90% dos pacientes exibiram altos níveis séricos dessa citocina, levando ao que se chama de assinatura de IFN, mas apenas 40% a 50% dos pacientes tinham uma atividade significativa de IFN, sugerindo que fatores adicionais são necessários para uma sensibilidade aos sinais liberados pelo IFN (Apostolidis *et al.*, 2011).

As células dendríticas (CDs) são células apresentadoras de antígenos provenientes do mesmo precursor de monócitos. São amplamente distribuídas pelos vários tecidos do corpo, permitindo a imunovigilância contra patógenos

invasores, sendo responsáveis por induzir a resposta imune contra partículas estranhas e por manter a autotolerância (Seitz, 2010). As CDs têm papel importante no desenvolvimento do LES e podem influenciar no surgimento da doença através da apresentação de autoantígenos, secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN I, e induzindo a produção de autoanticorpos pelas células B (Choi *et al.*, 2012).

Alguns dos principais eventos que ocorrem no LES são os distúrbios no mecanismo de apoptose ou desregulação na remoção de células apoptóticas (Rastin *et al.*, 2013). Normalmente, essas células são rapidamente removidas por fagócitos e seus conteúdos – proteínas e material nuclear – são internalizados e digeridos. No LES, os corpos apoptóticos permanecem no meio extracelular e são expostos ao sistema imune que não reconhece tais estruturas como próprias, resultando no surgimento exacerbado de antígenos autólogos (Abbas *et al.*, 2008). Esses autoantígenos são responsáveis por ativar CDs, as quais apresentam tais antígenos às células T que estimulam células B, levando a produção de autoanticorpos, como mostrado na Figura 2 (Tiffin *et al.*, 2013).

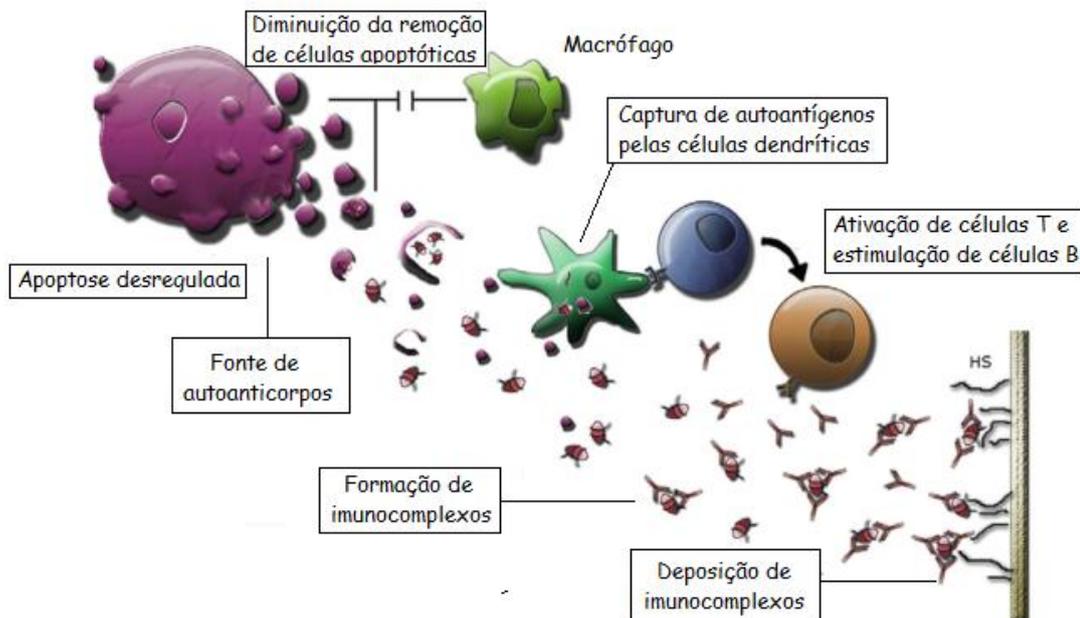


Figura 2. Mecanismo geral dos distúrbios de apoptose e desregulação na remoção de células apoptóticas, culminando na deposição de imunocomplexos. Adaptado de Tiffin *et al.* (2013).

A desregulação das imunidades inata e adaptativa promove a liberação de autoanticorpos contra, aproximadamente, 150 tipos diferentes de antígenos autólogos, dando início às lesões teciduais (Fortuna & Brennan, 2013). A produção de autoanticorpos causa a formação de imunocomplexos, os quais se depositam nos tecidos e ativam o sistema complemento, caso não sejam removidos há o desencadeamento da resposta inflamatória, causando o dano tecidual (Kytтарыs, 2010). Essa hipótese foi corroborada uma vez que diversos componentes do sistema complemento se mostraram alterados e tiveram seus genes associados com a susceptibilidade ao LES. Indivíduos com deficiência de C1q, C2 ou C4 apresentaram um risco maior de desenvolver LES do que pessoas saudáveis. Pessoas com deficiência de C1q mostraram um risco de 90% de desenvolvimento do LES, enquanto pessoas com níveis de C2 diminuídos e total ausência de C4, mostraram um risco de 10% e 75%, respectivamente (Tsokos, 2011). Tais achados mostram a importância do complemento tanto como primeira

linha de defesa contra patógenos, quanto no processo de desenvolvimento da autoimunidade, já que o sistema complemento opsoniza os imunocomplexos, facilitando a sua remoção, prevenindo, assim, o desencadeamento de uma resposta inflamatória (Kyttaris, 2010).

Os autoanticorpos são produzidos por células B autorreativas, as quais fazem parte do conjunto normal de células num organismo saudável. Entretanto, no LES, essas células desempenham uma função inadequada, provavelmente devido ao seu processo de maturação defeituoso (Kyttaris, 2010). As células B imaturas, que normalmente reconhecem e são ativadas contra autoantígenos durante seu processo de maturação, são submetidas aos mecanismos de tolerância imunológicos, evitando a presença dessas células autorreativas em órgãos do sistema imune periférico (Yurasov *et al.*, 2006). Populações de células B inativas em pacientes com LES apresentam mais da metade dessas células autorreativas antes mesmo do primeiro encontro com antígenos, o que indica falhas dos pontos de verificação durante a maturação desses linfócitos, resultando em um maior número de células B autorreativas produzindo autoanticorpos (Yurasov *et al.*, 2005). Entretanto, as células B não têm apenas a função de produzir autoanticorpos. Tais células podem também provocar a autoimunidade promovendo a apresentação de antígenos autólogos às células T, funcionando assim como APC (Tobón *et al.*, 2013).

Os linfócitos T, principalmente os T *helper* (Th), são responsáveis por estimular reações inflamatórias, secretando citocinas e recrutando mais leucócitos. Nas doenças autoimunes, como no LES, a interação de células T autorreativas, que escaparam dos mecanismos de autotolerância, com autoantígenos, promove a inflamação exacerbada característica dessas doenças

(Abbas *et al.*, 2008). Quando acoplado ao seu ligante, quer seja antígeno ou autoantígeno, o receptor de célula T (TCR) provoca, intracelularmente, uma cascata de sinalização, sendo que no LES, essa sinalização é precoce e amplificada (Kyttaris, 2010). Uma vez que o complexo CD3 do TCR é ativado, sinais intracelulares são desencadeados e podem bloquear a transcrição do gene da IL-2, levando a uma deficiência dessa citocina e, conseqüente redução de Tregs e supressão da ativação da morte celular de células T autorreativas (Crispín *et al.*, 2010; Lieberman & Tsokos, 2010; Tsokos, 2011). Linfócitos Tregs participam do controle da tolerância periférica e desordens nessas células podem contribuir para o desenvolvimento do LES. Chavele e Ehrenstein (2011) constataram uma relação inversa entre a capacidade de supressão dos Tregs e a atividade da doença, uma vez que no LES, a ativação descontrolada das células autorreativas B e T pode ser parcialmente atribuída à defeitos nos Tregs. O desequilíbrio entre células B e T autólogas e Tregs leva à autoimunidade (Chavele & Ehrenstein, 2011).

Essas alterações imunológicas, tanto da imunidade inata quanto da adaptativa, contribuem, em conjunto, para a patogênese do LES. Dessa maneira, as interações entre células dendríticas, células B e T autorreativas, auxiliam na produção de autoanticorpos, no desequilíbrio das citocinas e na infiltração tecidual de células inflamatórias, provocando o surgimento das manifestações clínicas do LES (Kyttaris, 2010).

2.1.4 Manifestações Clínicas

O diagnóstico do LES é feito de acordo com os critérios de classificação estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) (Fortuna & Brennan, 2013). Existem onze critérios para o LES, dentre os quais, ao menos quatro precisam estar presentes, simultaneamente no indivíduo, para que o diagnóstico da doença seja confirmado (Quadro 1) (Hochberg, 1997).

Quadro 1. Critérios para o diagnóstico do Lúpus Eritematoso Sistêmico de acordo com o ACR. Adaptado de Tsokos (2011).

CRITÉRIOS	DEFINIÇÃO
“rash” Malar	Eritema fixo, plano ou elevado, sobre as eminências malares, tendendo a poupar sulco nasolabial;
“rash” Discoide	Placas elevadas, eritematosas, com descamação ceratótica e crostículas;
Fotossensibilidade	Eritema cutâneo, às vezes maculopapular, como resultado de uma exposição solar;
Úlceras Orais	Úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente dolorosas;
Artrite	Artrite não erosiva, envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizada por sensibilidade, edema ou derrame articular;
Serosite	Pleurite ou pericardite;
Desordens Renais	Proteinúria e/ou desordens no sedimento urinário;
Distúrbios Neurológicos	Convulsões e psicose;
Desordens Hematológicas	Anemia, leucopenia, linfopenia e trombocitopenia;
Alterações Imunológicas	Presença dos anticorpos anti-dsDNA, anti-SM e antifosfolipídico;
Fator Anti-Nuclear	Presença de anticorpo antinuclear.

O LES apresenta-se em duas fases distintas: a fase pré-clínica e a fase clínica. A fase pré-clínica é a fase inicial da doença, caracterizada pelo desequilíbrio do sistema imune, mas sem o aparecimento total das manifestações clínicas, ocorrendo apenas sintomas inespecíficos como febre, fadiga e dor de cabeça. Com o passar do tempo, essas respostas imunológicas anormais tendem a aumentar, levando aos sintomas clínicos mais característicos da doença, cuja aparição determina a fase clínica do LES e seu estabelecimento no organismo, como mostra a figura 3. (Tobón *et al.*, 2013).

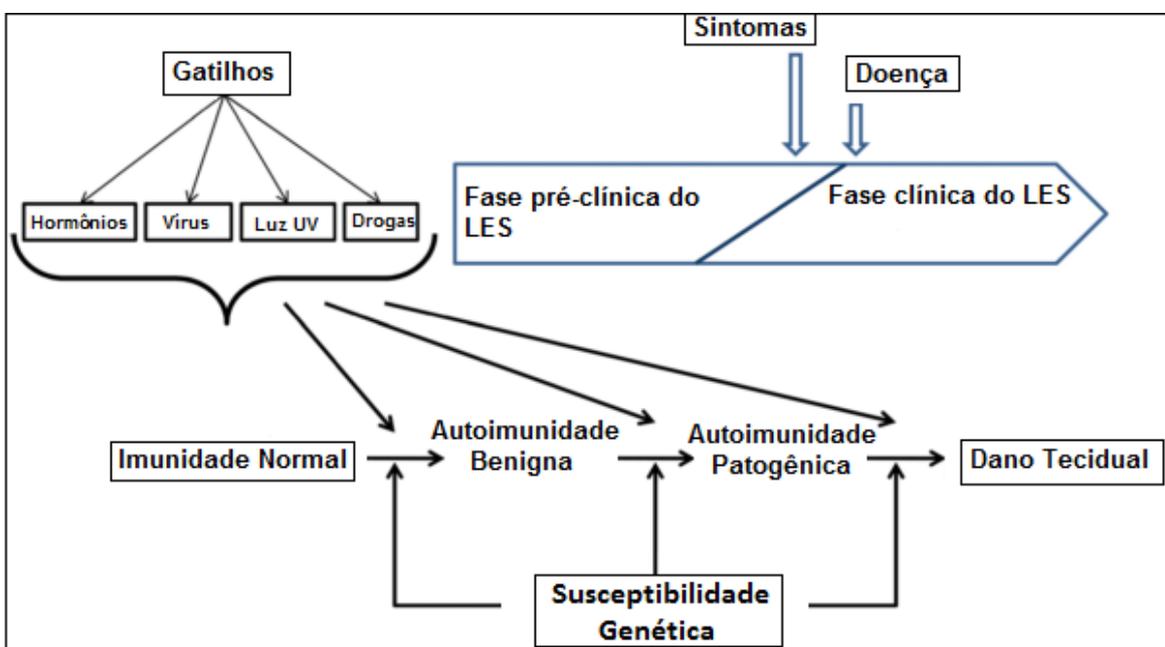


Figura 3. Esquema demonstrativo do estabelecimento do LES, seus fatores associados e suas fases. Adaptada de Tiffin, *et al.* (2013)

Os sintomas iniciais do LES são gerais e inespecíficos, como mal-estar, fadiga, febre baixa, perda de peso e adenomegalia e costuma evoluir com manifestações cutâneas e articulares, alterações hematológicas e sorológicas (Assis & Baaklini, 2009). Na figura 4, estão indicados os órgãos e sistemas mais atingidos pela doença.

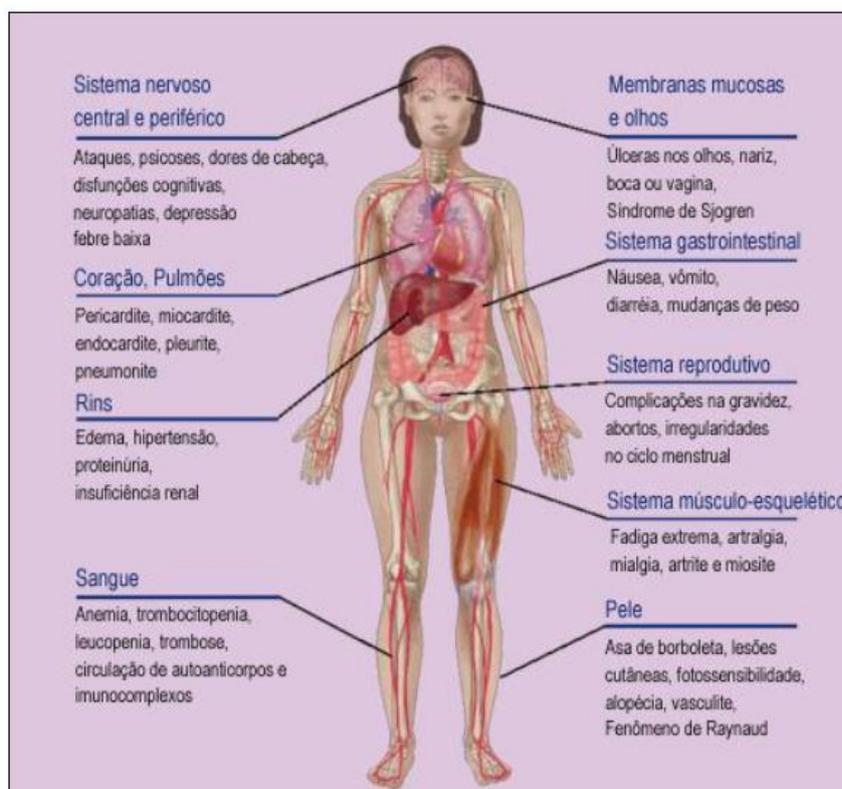


Figura 4. Manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com LES e os diferentes órgãos e sistemas envolvidos (Fonte: www.misodor.com/LUPUS.html).

As principais manifestações clínicas ocorrem na pele e nos sistemas nervoso, renal, sanguíneo e imunológico. Essas manifestações clínicas podem variar em grande proporção, com acometimentos concomitantes, aditivos ou sequenciais, cíclicos ou persistentes, agudos ou crônicos (Robinson, 2011).

O LES é caracterizado por períodos alternados de inatividade, atividade e progressão da doença (Fortuna & Brennan, 2013). O período de remissão é bastante instável e pode durar semanas, meses ou até anos; o período de atividade geralmente é uma exacerbação dos sintomas já estabelecidos; e a progressão é caracterizada pelo aparecimento de novos sintomas. Fatores como estresse, infecções, exposição excessiva ao sol, causas emocionais ou interrupção do tratamento são possíveis razões para o reestabelecimento da atividade da doença (Robinson, 2011).

A pele é um dos órgãos mais afetados pelo LES, com aproximadamente 85% dos pacientes acometidos por manifestações cutâneas, como “rash” malar, fotossensibilidade, “rash” discoide e alopecia (Uva *et al.*, 2012). O “rash” malar, conhecido também por lesão em forma de asa de borboleta (Figura 5), consiste em uma erupção eritematosa sobre as bochechas e o nariz, que pode ser dolorosa e com prurido (Fortuna & Brennan, 2013). Esse tipo de lesão ocorre em 30% dos pacientes com LES (Cojocaru *et al.*, 2011). Lesões discoides podem ser localizadas ou generalizadas, em forma de disco, e caracterizadas por placas eritematosas de diferentes tamanhos com hiperqueratose folicular (Fortuna & Brennan, 2013). O “rash” discoide muitas vezes é desenvolvido em áreas expostas ao sol. A fotossensibilidade é responsável pela formação de erupções cutâneas devido à exposição à luz ultravioleta, principalmente na face, nos braços e mãos (Uva *et al.*, 2012).



Figura 5. Rash malar ou lesão em asa de borboleta – frequente nos pacientes com LES. Fonte: Uva *et al.*, (2012)

Os sintomas referentes ao aparelho locomotor tendem a ser assimétricos, migratórios e moderadamente dolorosos, com comprometimento dos dedos das mãos, punhos, joelhos e, com menor frequência, dos cotovelos, ombros, quadris e

tornozelos (Aparecida *et al.*, 2013). As manifestações musculoesqueléticas mais comuns no LES são artralgia, artrite lúpica e osteonecrose e podem envolver as articulações das mãos, punhos e joelhos (Cojocarú *et al.*, 2011). Aproximadamente 90% dos pacientes apresentam dores articulares no início da doença (Assis & Baaklini, 2009).

O sistema cardiovascular é acometido pelo LES em cerca de 58% a 77% dos pacientes. As alterações nesse sistema podem afetar o pericárdio, o miocárdio, as válvulas cardíacas e as artérias coronárias (Lalani *et al.*, 2004; Goh *et al.*, 2012). A pericardite é uma das manifestações cardíacas do LES mais comum, sendo um dos critérios de inclusão usados para o diagnóstico da doença na classificação da ACR (Hochberg, 1997).

O acometimento renal contribui de forma crítica para a morbidade e mortalidade da doença. As desordens nefríticas ocorrem em pelo menos metade dos pacientes em algum momento do desenvolvimento da doença, e cerca de 10% dos pacientes evoluem para insuficiência renal crônica em cinco anos (Assis & Baaklini, 2009). As manifestações renais podem se manifestar de forma leve, apresentando proteinúria, ou como uma forma mais grave, com uma glomerulonefrite aguda ou crônica. A glomerulonefrite lúpica é consequência da deposição de imunocomplexos nos glomérulos do rim (Goh *et al.*, 2012).

O envolvimento vascular é frequente em indivíduos com LES. Entre as várias manifestações vasculares presentes, estão as vasculites cutâneas, as quais são observadas principalmente em vasos de pequeno calibre; o Fenômeno de Raynaud que se caracteriza por uma resposta vascular exagerada a baixas temperaturas e ao estresse emocional; e a vasculopatia livedoide, a qual está

associada com ulcerações crônicas dos membros inferiores (Uva *et al.*, 2012; Radic *et al.*, 2013).

Ao longo da evolução do LES, mais da metade dos pacientes com LES desenvolvem alterações hematológicas (Assis & Baaklini, 2009), que vão desde anormalidades na formação de elementos do sangue, da coagulação e fatores fibrinolíticos, até de sistemas relacionados. As manifestações hematológicas mais relevantes do LES são anemia, leucopenia, trombocitopenia e a Síndrome do Anticorpo Antifosfolípido (SAAF) (Sasidharan *et al.*, 2012).

As alterações neurológicas acometem de 25% a 70% dos pacientes com LES e podem afetar qualquer parte do sistema nervoso (Cojocarú *et al.*, 2011). O envolvimento do sistema nervoso central é considerado uma das maiores causas de mortalidade e morbidade em pacientes com LES (Goh *et al.*, 2012). Segundo a classificação da ACR, pode ocorrer o comprometimento do sistema nervoso central levando às seguintes alterações: estado confusional agudo, disfunção cognitiva, psicose, distúrbios do humor, distúrbios da ansiedade, cefaleia, doença cerebrovascular, mielopatia, distúrbios do movimento, síndromes desmielinizantes, convulsões e meningite asséptica; assim como distúrbios do sistema nervoso periférico tais como: neuropatia cranial, polineuropatia, plexopatia, mononeuropatia simples ou múltipla, polirradiculoneuropatia aguda inflamatória desmielinizante (síndrome de Guillain-Barré), distúrbio autonômico e miastenia gravis (Assis & Baaklini, 2009). Entretanto, as manifestações neurológicas mais comuns são as dores de cabeça e transtornos de humor (Cojocarú *et al.*, 2011).

Um estudo recente mostrou que entre os pacientes com LES 7,8/100 por ano apresentam envolvimento grave do sistema nervoso central, tais como:

crises epilépticas, acidente vascular cerebral, mielopatia, neurite óptica, meningite asséptica e psicose aguda. Entre essas alterações, as crises epilépticas foram associadas com a atividade exacerbada da doença, enquanto a mielopatia foi relacionada com a baixa atividade da doença nesses pacientes (Kampylafka *et al.*, 2013).

Sendo a produção de autoanticorpos contra uma grande variedade de componentes celulares uma das principais características do LES, as alterações imunológicas são consideradas critérios para o diagnóstico da doença (Crispín *et al.*, 2010). Os anticorpos anti-nucleares (ANA) existem em 95% das mulheres com LES. Os anticorpos anti-DNA de dupla cadeia são positivos em cerca de 75% dos pacientes e são correlacionados com atividade e exacerbação da doença. Os anticorpos anti-Smith (anti-Sm) estão presentes em 30% dos casos e são específicos para LES. Os anticorpos anti-SSA/Ro são dirigidos contra o antígeno SSA/Ro, uma proteína nuclear e citoplasmática ligada ao RNA, e estão presentes em 30% dos pacientes. Os anticorpos anti-SSB/La são encontrados em 10% dos pacientes e são dirigidos contra o antígeno SSB/La que é uma fosfoproteína nuclear associada ao RNA. Aproximadamente metade das mulheres com LES apresentam anticorpos antifosfolipídeos e cerca de 25% se enquadram na SAAF, a qual é caracterizada por agregação plaquetária e formação de trombos (Ruiz-Irastorza *et al.*, 2010; Diniz-da-Costa *et al.*, 2012; Radic *et al.*, 2013). Apesar da presença desses autoanticorpos ser uma característica constante na doença, a sua concentração e diversidade variam entre os pacientes (Nath *et al.*, 2004).

2.2 A Genética do LES

Os fatores genéticos têm grande importância na fisiopatologia do LES. Estudos familiares mostram que a concordância entre gêmeos dizigóticos é de

cerca de 5%, enquanto que a de gêmeos idênticos varia de 25% a 55%. A taxa de herdabilidade da doença supera 66%. Dessa forma, 10% dos pacientes com LES têm, pelo menos, outro membro da família acometido pela doença (Mathian *et al.*, 2013). A maior prevalência do LES em determinados grupos étnicos também reforça a influência genética subjacente à doença (Tiffin *et al.*, 2013).

Mutações monogênicas estão associadas ao desenvolvimento do lúpus em apenas 5% dos pacientes, como no caso dos componentes do complemento C1q e C4 (Mathian *et al.*, 2013). A deficiência de C4 tem sido associada a uma diminuição na eliminação de células B autorreativas, enquanto a falta de C1q leva à eliminação deficiente de resíduos apoptóticos. Entretanto, a doença comumente resulta do efeito combinado de vários genes. Uma vez que cada alelo contribui minimamente, o efeito cumulativo de um grande número de genes é necessário para aumentar a predisposição ao LES (Tsokos, 2011).

Estudos de ligação baseados em análise familiar e análise de associação genômica em larga escala (GWAS) vêm sendo utilizados na tentativa de determinar a predisposição genética no LES. Todos esses estudos indicam a existência de um sistema complexo, no qual múltiplos genes podem participar da determinação da doença (Delgado-Vega *et al.*, 2010). A maior parte dos genes candidatos na patogênese do LES codificam proteínas que participam de diversas funções, tanto na imunidade inata quanto na adaptativa (Mathian *et al.*, 2013).

O complexo de histocompatibilidade humano (HLA) localizado na região cromossômica 6p21, codifica mais de 200 genes, a maioria com funções imunológicas. Essa região foi a primeira associação genética descrita no LES (Goldberg *et al.*, 1976). Estudos de GWAS mostraram que a região do HLA apresenta uma forte contribuição no risco de desenvolvimento do LES com

múltiplos efeitos genéticos, em populações de origem europeia e asiática. A maioria dos genes do HLA estudados até hoje são de classe II, como por exemplo, o HLA-DR2 e o HLA-DR3, os quais mostraram associações significativas com o LES em várias populações europeias, com o dobro do risco de desenvolvimento da doença para cada alelo (Deng & Tsao, 2010).

Na última década, vários outros polimorfismos foram estudados em diferentes genes e associados com a susceptibilidade ao LES, sendo que dentre esses genes estão citados principalmente os relacionados diretamente ao sistema imune como o fator de necrose tumoral α (*TNF* α), o receptor da célula T (*TCR*), a Interleucina 6 (*IL* 6), o receptor do complemento 1 (*CR1*), o *FcyRIIA* e *FcyRIIIA* (ambos receptores Fc da IgG) (Taylor *et al.*, 2011). Sendo assim, o desenvolvimento da doença envolve pequenas variações em diversos genes que podem contribuir com a desregulação da resposta imune e conseqüentemente para o estabelecimento do lúpus (Tsokos, 2011). A figura 6 mostra os loci e genes associados com o lúpus, divididos em seis categorias de acordo com as funções dos genes.

O gene *IRF5* (fator regulador de Interferon 5) está entre os genes mais bem caracterizados no LES. O gene *IRF5* codifica o principal fator de transcrição na via do IFN tipo I e seus polimorfismos rs2070197, rs10488631 e rs12539741 foram associados com o desenvolvimento do LES nos Estados Unidos e Reino Unido (Graham *et al.*, 2007). O produto deste gene atua regulando genes dependentes do IFN, citocinas inflamatórias e genes envolvidos na apoptose (Yu *et al.*, 2012).

O gene *PTPN22* (Proteína tirosina fosfatase, não-receptor tipo 22), que codifica uma proteína que inibe a atividade de linfócitos T, apresenta um

polimorfismo de base única não sinônimo (rs2476601) [A>G] que está associado com a susceptibilidade à diversas doenças autoimunes, incluindo o LES (Taylor *et al.*, 2011). Esse polimorfismo causa a substituição de um aminoácido que aumenta a atividade intrínseca da proteína, reduzindo a sinalização desencadeada pelos receptores de células T, o que pode induzir a autoimunidade através de alterações na seleção de linfócitos autorreativos e redução da atividade e do número de Tregs (Yang *et al.*, 2009).

O gene *CTLA-4* (Antígeno de linfócito T citotóxico 4) vem sendo descrito como um dos mais importantes genes de susceptibilidade a doenças autoimunes. A proteína codificada por esse gene é expressa na superfície de linfócitos T ativados com uma função regulatória inibitória sobre essas células (Teft *et al.*, 2006). O gene *BANK 1* (*B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1*) codifica uma proteína adaptadora que faz parte da ativação de células B. Os polimorfismos no *BANK1* podem contribuir na alteração da manutenção da ativação dos receptores de células B, bem como para a hiperatividade dessas células, comumente observada nos pacientes com LES (Kozyrev *et al.*, 2008).

Além de estudos genéticos de associação de polimorfismos com o desenvolvimento do LES, estudos de expressão gênica também vêm sendo realizados para a identificação de genes candidatos que possam ser úteis para o entendimento da patogênese, diagnóstico e prognóstico do LES (Sandrin-Garcia *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012).

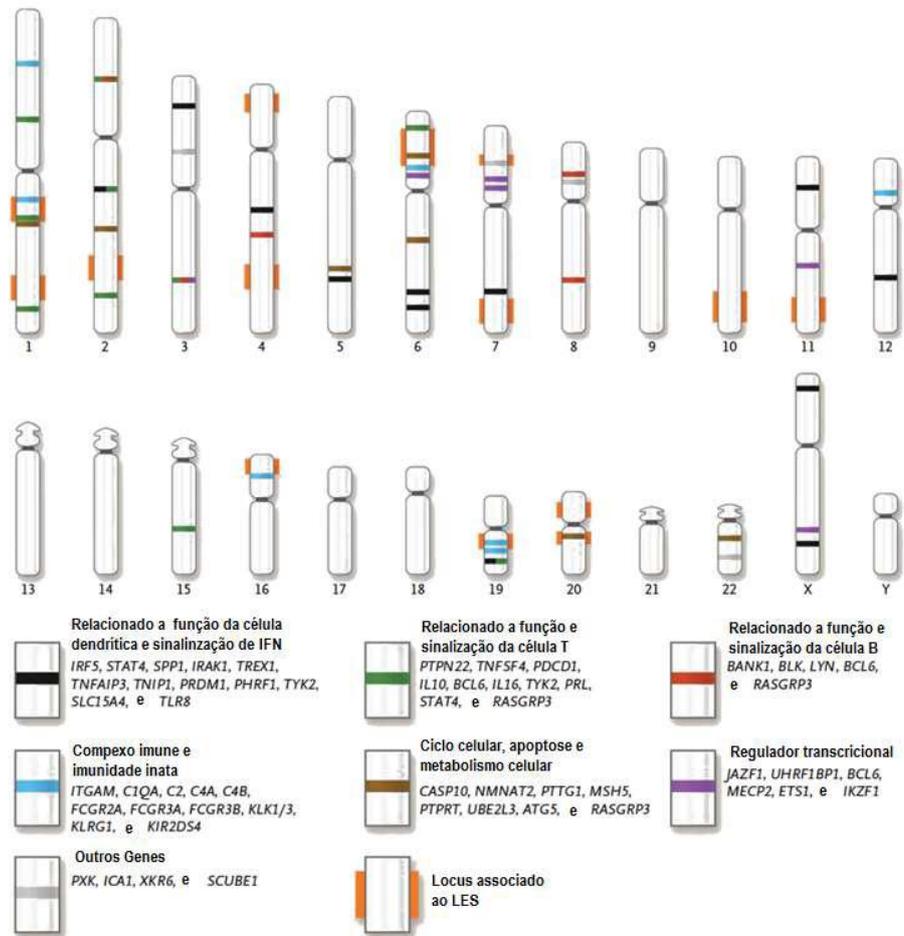


Figura 6. Genes associados ao desenvolvimento do LES com suas respectivas localizações cromossômicas e funções. Adaptado de Tsokos (2011).

2.2.1 Gene Semaforina 4A

As semaforinas compreendem uma família de glicoproteínas solúveis e transmembranas filogeneticamente conservadas (Yu & Kolodkin, 1999). Essas moléculas são divididas em oito subclasses com base na semelhança de suas sequências e nas características estruturais, como mostra a Figura 8 (Kumanogoh *et al.* 2002). As semaforinas são caracterizadas por apresentar uma sequência extracelular homóloga, rica em cisteína, com aproximadamente 500 aminoácidos, denominada domínio de semaforina (Sema) (Smith *et al.*, 2011). As semaforinas

que pertencem às subclasses 1 e 2 foram descobertas em espécies de invertebrados, já as subclasses de 3 a 7 são semaforinas de espécies de vertebrados. A última subclasse contém semaforinas descobertas em vírus (Kumanogoh & Kikutani, 2003). Semaforinas das classes 2 e 3 são proteínas secretadas, enquanto as da classe 7 são proteínas ancoradas via GPI (glicosil-fosfatidil-inositol); o restante das classes são de proteínas transmembranas (Yang *et al.*, 2009; Vadasz & Toubi, 2013).

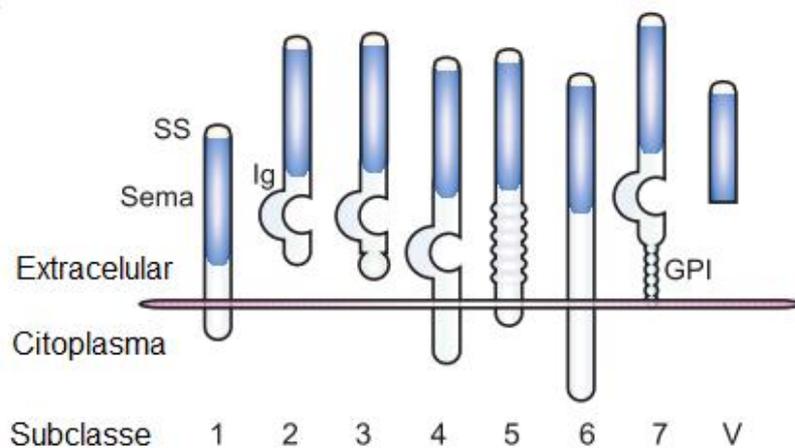


Figura 7. Estrutura da família das semaforinas. As proteínas podem ser ligadas à membrana ou solúveis, mas todas possuem o domínio sema. Adaptado de Kumanogoh & Kikutani (2003).

As semaforinas foram primeiramente descritas nas células do sistema nervoso e estão envolvidas na orientação de axônios durante o desenvolvimento neuronal. As semaforinas também estão envolvidas na organogênese, vascularização, angiogênese e progressão do câncer (Kumanogoh & Kikutani 2013). No sistema imune, as semaforinas são conhecidas como semaforinas imunes e participam de diversas fases das respostas imunológicas normais e patológicas. Algumas semaforinas podem suprimir a ativação e proliferação de

células imunes, enquanto outras estão envolvidas na estimulação das respostas imunológicas (Takamatsu & Kumanogoh, 2012).

Entre as semaforinas imunes, a semaforina 4A (Sema4A) é membro da classe 4 de proteínas transmembranas e é expressa constitutivamente. Sua expressão aumenta progressivamente durante o desenvolvimento embrionário e o mRNA (RNA mensageiro) do *SEMA4A* pode ser encontrado em vários níveis de expressão nos seguintes tecidos de adultos: cérebro (35 vezes), timo (21 vezes), pulmões (10 vezes), amígdalas (9 vezes) (Kumanogoh & Kikutani, 2003; Vadasz & Toubi, 2013) (www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Assembly/).

A Sema4A é expressa na superfície de células dendríticas e células B inativas, mas não em células T em repouso, embora sua expressão possa ser levemente induzida em células T ativadas. A Sema4A derivada de APCs e a Sema4A proveniente de células T desempenham funções diferentes na resposta imune. Enquanto a proteína derivada, principalmente, de células dendríticas é crucial para ativação inicial das células T, a Sema4A de células T está envolvida na diferenciação de células Th (Okuno *et al.*, 2011, Linder *et al.*, 2013;). O padrão de expressão dessa proteína indica que ela está envolvida na ativação de células T via APCs e que também atua como sinal coestimulatório para as células T (Kumanogoh & Kikutani, 2003). Segundo Nkyimbeng-Takwi *et al.* (2012), Sema4A em APCs aumenta a ativação e diferenciação de células T através da interação com o seu receptor Tim-2 “*in vitro*”. “*In vivo*” ocorre a produção de células T específicas para o antígeno. A Sema4A também aumenta a proliferação e produção de IL-2 pelas células T em resposta à estimulação com o anticorpo específico-CD3 (Nkyimbeng-Takwi *et al.*, 2012).

O papel da Sema4a em respostas imunes *in vivo* foi esclarecido com a utilização de Sema4A solúvel e anticorpos monoclonais anti-Sema4A em camundongos com encefalomielite imune experimental (EAE). A proteína solúvel aumentou significativamente a produção de células T antígeno-específicas e, conseqüentemente, a exacerbação da doença. Com a administração dos anticorpos anti-Sema4A houve o bloqueio da ativação inicial dessas células T e inibição da doença. Entretanto, a administração tardia de anticorpos anti-Sema4A, após o primeiro contato com o antígeno indutor da EAE, não fez qualquer efeito sobre a doença, indicando que Sema4A atua na fase inicial da ativação de células T antígeno-específicas, sugerindo que Sema4A exibe propriedades imunorreguladoras mais eficientes no início da resposta imune (Kumanogoh *et al.*, 2002).

No sistema imune, o receptor do Sema4A é o Tim-2 (domínio de mucina e imunoglobulina de célula T-2), como mostrado na figura 8. A família de proteínas TIM é expressa em células T e é caracterizada por um conjunto conservado de domínios de mucina e imunoglobulina. Outros membros dessa família de receptores também desempenham papel na resposta imune mediada por célula T, como Tim-1 e Tim-3. Dessa forma os ligantes desses receptores, como o Sema4A, tendem a ser moléculas reguladoras que influenciam a ativação e diferenciação de células T (Kumanogo & Kikutani, 2003).

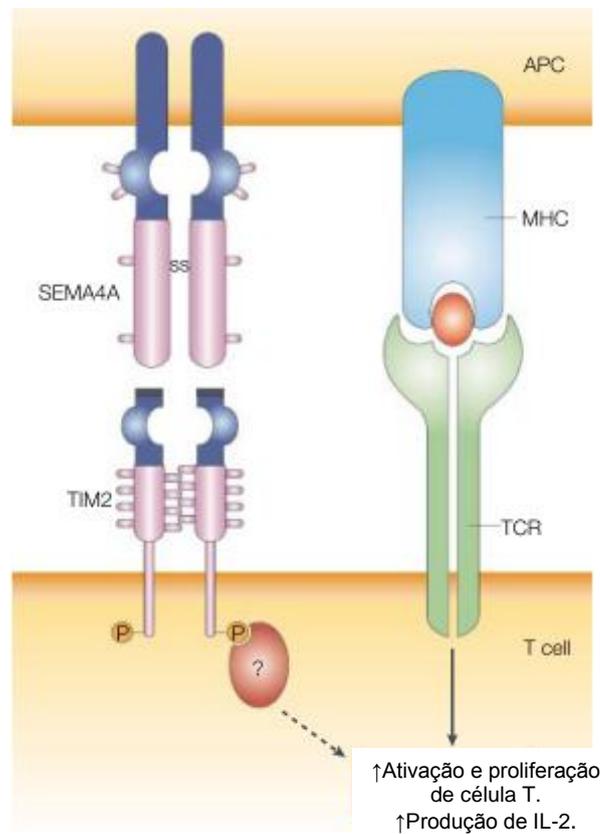


Figura 8. Envolvimento do Sema4A na ativação de célula T através do Tim-2. Adaptado de Kumanogoh & Kikutani (2003).

O gene Semaforina 4A (*SEMA4A*) está localizado no cromossomo 1 (1q22) e codifica uma proteína membro da família das semaforinas, a Sema4A (Semaphorin Nomenclature Committee, 1999). Esse gene é constituído por 15 éxons e 35 íntrons distribuídos em 24.150 pares de bases. Há, provavelmente, 8 possíveis promotores no gene. A transcrição produz 27 formas diferentes de mRNA, sendo 25 variantes de *splicing* e 2 formas não excisadas (Figura 9).

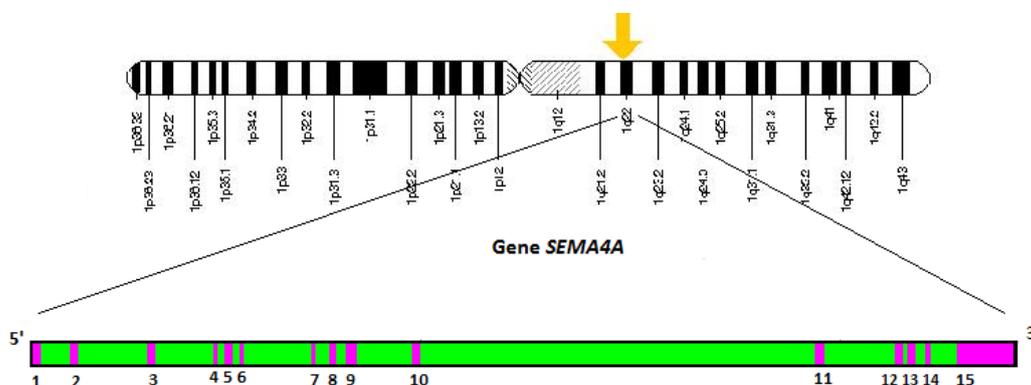


Figura 9. Localização cromossômica indicada pela seta amarela e representação do gene *SEMA4A* com seus 15 éxons. Adaptado de SNPbrowser 4.0.

Mutações no gene *SEMA4A* estão associadas com doenças oculares degenerativas, como a retinite pigmentosa tipo 35 (RP35) e a distrofia dos cones e bastonetes tipo 10 (CORD10). Abid *et al.* (2006) identificaram as primeiras mutações no gene em humanos, associando-as com doenças degenerativas da retina. No estudo, eles analisaram 190 pacientes com várias dessas doenças, tais como retinite pigmentosa e distrofia dos cones e bastonetes, e encontraram 3 mutações pontuais no gene *SEMA4A*. No éxon 10, foram observadas a substituição de G>C, causando uma mudança no códon 345, resultando na mutação conservativa D345H; e a substituição de T>G provocando alteração no códon 350, dando origem a mutação não-conservativa F350C. No éxon 15, a substituição de G>A no códon 713 causa a mutação conservativa R713Q (Abid *et al.*, 2006).

No LES há uma desregulação imunológica geral causada pela quebra da autotolerância em células B e T, onde Sema4A é expressa. Sabendo que o gene *SEMA4A* mostrou-se diferencialmente expresso nos pacientes com LES, no estudo de Sandrin-Garcia *et al.* (2009), pode-se sugerir que SNPs neste gene podem alterar, de alguma forma, a proteína produzida, levando a uma resposta imune mediada por células T exacerbada. Sendo assim, a detecção de polimorfismos no gene *SEMA4A* e sua susceptibilidade ao LES, poderão contribuir significativamente para a compreensão do processo de susceptibilidade à doença.

3. Objetivos

3.1 Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a frequência de polimorfismos de base única (SNPs) no gene *SEMA4A* com a susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e suas manifestações clínicas em pacientes de duas populações brasileiras.

3.2 Específicos

1. Determinar a frequência dos SNPs rs3738582 [C>G], rs12401573 [C>T], rs7695 [C>T] e rs3738581 [C>T] do gene *SEMA4A* em pacientes com LES e indivíduos saudáveis;
2. Avaliar o grau de associação desses polimorfismos com a susceptibilidade ao LES;
3. Avaliar o grau de associação desses polimorfismos com as manifestações clínicas do LES.
4. Avaliar a presença de haplótipos entre os SNPs analisados no gene *SEMA4A*.
5. Caracterizar o perfil clínico/laboratorial dos pacientes com LES das populações estudadas,

4. Material e Métodos

4.1 Amostras

O grupo de estudo deste trabalho foi composto por duas populações brasileiras, uma do Sudeste e outra do Nordeste, como descrito a seguir.

4.1.1 População 1: Sudeste

Amostras de DNA genômico de 158 pacientes foram utilizadas, dos quais 93% (147) eram mulheres e 7% (11) homens, com idade média de 37,8 anos e desvio padrão de $\pm 11,9$. O diagnóstico de LES foi realizado de acordo com critérios definidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) (Hochberg 1997). Essas amostras fazem parte do banco de amostras de pacientes, obtidas no Ambulatório e Enfermarias da Divisão de Imunologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP/USP), por meio de convênio de cooperação científica firmado com o Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi do Departamento de Clínica Médica da FMRP/USP. Como controles, foram utilizadas amostras de DNA genômico de 189 indivíduos saudáveis, voluntários, escolhidos aleatoriamente na população do Sudeste brasileiro. Genotipagem para HLA-A, B, C e DR/DQ foram feitas para excluir o risco de haplótipos HLA do grupo controle, além da presença de doenças autoimunes nesses indivíduos e seus familiares de primeiro grau. A coleta, manutenção e manuseio das amostras foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa, protocolo (#2234/2007). Os pacientes foram estratificados segundo as manifestações clínicas, sexo e etnia, como descritos na tabela 1.

Tabela 1. Descrição das características clínicas dos pacientes com LES do Sudeste brasileiro.

Características Clínicas dos Pacientes	n (%)
Sexo	
Feminino	147 (93,04%)
Masculino	11 (6,96%)
Etnia	
Descendentes de Europeu	120 (75,95%)
Descendentes de Africano	38 (24,05%)
Manifestações Clínicas e Laboratoriais	
Alterações Cutâneas	88 (55,7%)
Fotossensibilidade	45 (28,5%)
Artrite	68 (43%)
Serosite	40 (25,3%)
Lúpus Nefrítico	87 (55,1%)
Distúrbios Neurológicos	30 (19%)
Alterações Hematológicas	84 (53,2%)
Alterações Imunológicas	87 (55,1%)
Fator Antinuclear positivo (FAN)	129(81,64%)
Anticorpo Anti-DNA (anti ds-DNA)	34 (21,52%)
Síndrome Antifosfolípida	52 (32,9%)
Fenômeno de Raynaud	8 (5,06%)

4.1.2 População 2: Nordeste

No total, foram analisados para a população do Nordeste 122 pacientes, entre os quais 97,5% (119) eram mulheres e 2,5% (3) homens, com idade média 37,5 anos e desvio padrão $\pm 10,4$. O diagnóstico de LES foi feito de acordo com critérios definidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) (Hochberg, 1997). Essas amostras fazem parte da Divisão de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Como controles, foram utilizadas amostras de DNA genômico de 159 indivíduos, voluntários, sem histórico familiar de doenças autoimunes na população do Nordeste brasileiro. Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética do CCS (CAAE

03065312.3.0000.5208). Os pacientes foram estratificados segundo as manifestações clínicas, sexo e etnia, como descritos na tabela 2.

Tabela 2. Descrição das características clínicas dos pacientes com LES do Nordeste brasileiro.

Características Clínicas dos Pacientes	N (%)
Sexo	
Feminino	120 (98%)
Masculino	2 (2%)
Etnia	
Descendentes de Africano	95 (77,87%)
Descendentes de Europeu	27 (22,13%)
Manifestações Clínicas e Laboratoriais	
“rash” Malar	74 (60,7%)
“rash” Discoide	20 (16,4%)
Fotossensibilidade	84 (68,8%)
Artrite	90 (73,7%)
Úlceras	25 (20,5%)
Serosite	26 (21,3%)
Alterações Hematológicas	85 (69,6%)
Lúpus Nefrítico	62 (50,8%)
Distúrbios Neurológicos	11 (9%)
Alterações Imunológicas	42 (34,4%)
Anticorpo Anti-DNA (anti ds-DNA)	31 (25,4%)

4.1.3 Extração de DNA

O DNA genômico dos pacientes do Sudeste brasileiro foi extraído do sangue total periférico, usando o método *salting out* como descrito por Sambrook *et al.* (1989). A extração do DNA genômico, a partir do sangue total periférico, nos pacientes do Nordeste foi realizada utilizando o kit de purificação de DNA genômico (*Promega, Madison, WI*), de acordo com o protocolo padrão fornecido pelo fabricante.

4.2 Seleção dos SNPs e Genotipagem

Os SNPs estudados foram selecionados através do programa *SNPBrowser* 4.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) e pelo banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). A seleção dos SNPs considerou os seguintes critérios: Tag SNPs, frequência alélica mínima (MAF) de 10% e distribuição ao longo do gene estudado. Desta forma, quatro SNPs foram selecionados no gene *SEMA4A* (rs3738582 [C>G] localizado na região 5'UTR; rs12401573 [C>T] localizado no éxon 15; rs7695 [C>T] localizado na região 3'UTR e rs3738581 [C>T] próximo à 3'UTR), como mostrado na figura 10.

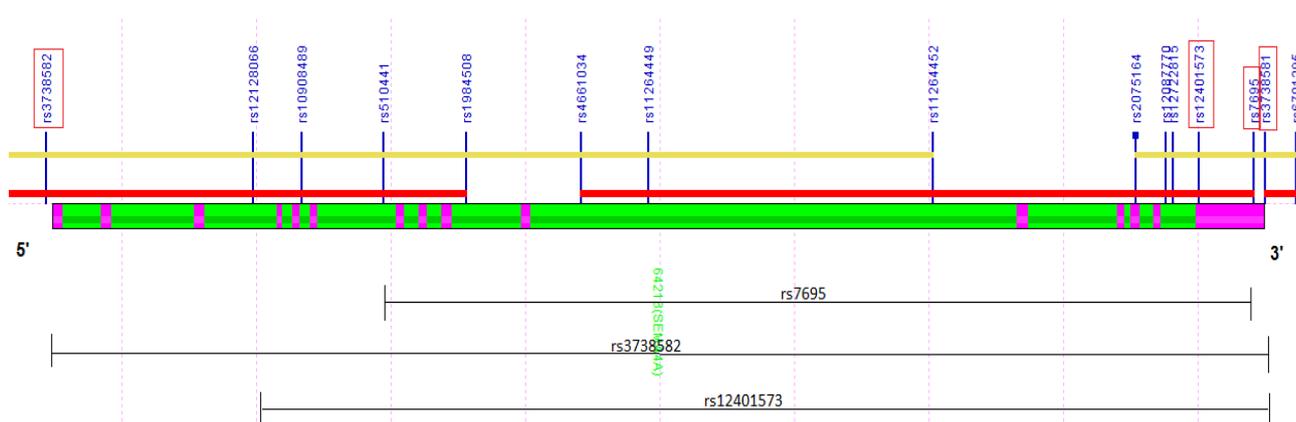


Figura 10. Posição dos SNPs e a área que eles representam no gene. Adaptado de SNPbrowser 4.0.

Para a genotipagem dos polimorfismos, sondas fluorogências alelo-específicas (Taqman Probes, Applied Biosystems, Foster City, CA) foram utilizadas na plataforma de PCR em Tempo Real ABI7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

4.3 Análises de Dados

A ferramenta *SNPStats* (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>) foi utilizada para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg da população de estudo e calcular as frequências alélicas e genotípicas. Para correlacionar as frequências alélicas e gênicas à susceptibilidade ao LES e às suas manifestações clínicas foi utilizado o Teste Exato de Fisher pelo programa R versão 2.1.1 (<http://cran.r-project.org/mirrors.html>), considerando $p\text{-value} \leq 0,0125$ estatisticamente significativo. Para a análise dos haplótipos foi utilizado o programa Haploview, versão 4,2. Valores de $p \leq 0,0125$ foram considerados estatisticamente significantes. Para ajustar o $p\text{-value}$ para testes múltiplos foi aplicada a correção de Bonferroni ($p \leq 0,0125$).

5. Resultados

5.1 Associação dos SNPs no Gene *SEMA4A* e a Susceptibilidade ao LES

As frequências alélicas e genóticas dos SNPs estão descritas nas tabelas 3 e 4. Todos os SNPs analisados estavam em equilíbrio de Hardy–Weinberg em ambos os grupos de pacientes e controles.

O SNP rs3738581 apresentou associação com a susceptibilidade ao LES em ambas as populações estudadas, onde o alelo T mostrou um fator de risco aumentado, tanto na população do Sudeste (OR = 1,81, IC = 1,32 - 2,48, $p = 0,12 \times 10^{-3}$) quanto do Nordeste (OR = 2,48, IC = 1,94 - 4,16 $p = 0,1 \times 10^{-9}$). Para a população do Sudeste os genótipos T/T (OR = 3,60, IC = 1,79 - 7,38, $p = 0,1 \times 10^{-3}$) e C/T (OR = 2,36, IC = 1,35 - 4,21, $p = 0,13 \times 10^{-2}$) também mostraram risco aumentado para o desenvolvimento da doença. Já para a população do Nordeste, foram observadas as seguintes associações: genótipo T/T (OR = 13,17, IC = 4,56 - 47,01, $p = 0,9 \times 10^{-10}$); genótipo C/T (OR = 2,12, IC = 1,22 - 3,71, $p = 0,58 \times 10^{-2}$), ambas conferindo susceptibilidade à doença. Todas as associações foram estatisticamente significantes após a correção de Bonferroni ($p\text{-value} < 0,0125$).

Os SNPs rs7695, rs3738582 e rs12401573 não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre as frequências alélicas e genóticas quando comparados os pacientes com LES e indivíduos controles, tanto do Sudeste quanto do Nordeste brasileiros.

Tabela 3. Distribuição das frequências alélicas e genótípicas do gene *SEMA4A* nos pacientes e controles do Sudeste analisados.

SNP	Pacientes n (%)	Controles n (%)	Odds Ratio (95% IC)	p-value
rs7695				
Alelo	316	378		
C	206 (65%)	268 (71%)	1,00	
T	110 (35%)	110 (29%)	1,30 (0,93 – 1,81)	0,11
Genótipo	158	189		
CC	65 (41%)	91 (48%)	1,00	
CT	76 (48%)	86 (46%)	0,90 (0,56 – 1,44)	0,73
TT	17 (11%)	12 (6%)	1,97 (0,82 – 4,87)	0,10
rs3738582				
Alelo	316	378		
C	231 (73%)	275 (73%)	1,00	
G	85 (27%)	103 (27%)	0,98 (0,69 - 1,39)	0,93
Genótipo	158	189		
CC	83 (53%)	97 (51%)	1,00	
CG	65 (41%)	81 (43%)	0,93 (0,38 - 2,91)	0,82
GG	10 (6%)	11 (6%)	1,06 (0,34 - 2,60)	1,00
rs12401573				
Alelo	316	378		
C	172 (54%)	193 (51%)	1,00	
T	144 (46%)	185 (49%)	0,87 (0,64 - 1,19)	0,4
Genótipo	158	189		
CC	50 (32%)	46 (25%)	1,00	
CT	72 (45%)	101 (53%)	0,65 (0,38 - 1,11)	0,12
TT	36 (23%)	42 (22%)	0,78 (0,41 – 1,49)	0,45
rs3738581				
Alelo	316	378		
C	144 (46%)	228 (60%)	1,00	
T	172 (54%)	150 (40%)	1,81 (1,32 - 2,48)	0,12x10⁻³
Genótipo	158	189		
CC	27 (17%)	67 (35%)	1,00	
CT	90 (57%)	94 (50%)	2,36 (1,35 - 4,21)	0,13x10⁻²
TT	41 (26%)	28 (15%)	3,60 (1,79 – 7,38)	0,1x10⁻³

Tabela 4. Distribuição das frequências alélicas e genóticas do gene *SEMA4A* nos pacientes e controles do Nordeste analisados.

SNP	Pacientes n (%)	Controles n (%)	Odds Ratio (95% IC)	p-value
rs7695				
Alelo	244	318		
C	160 (66%)	208 (65%)	1,00	
T	84 (34%)	110 (35%)	0,99 (0,68 - 1,43)	1,00
Genótipo	122	159		
CC	52 (43%)	69 (43%)	1,00	
CT	56 (46%)	70 (44%)	1,06 (0,62 - 1,81)	0,89
TT	14 (11%)	20 (13%)	0,92 (0,39 - 2,14)	1,00
rs3738582				
Alelo	244	316		
C	182 (75%)	243 (77%)	1,00	
G	62 (25%)	73 (23%)	1,13 (0,75 - 1,70)	0,55
Genótipo	122	159		
CC	68 (56%)	90 (57%)	1,00	
CG	46 (38%)	63 (40%)	0,96 (0,57 - 1,62)	0,90
GG	8 (7%)	5 (3%)	2,10 (0,57 - 8,57)	0,24
rs12401573				
Alelo	240	312		
C	129 (54%)	170 (54%)	1,00	
T	111 (46%)	142 (46%)	1,03 (0,72 - 1,46)	0,86
Genótipo	120	156		
CC	37 (31%)	47 (30%)	1,00	
CT	55 (46%)	76 (49%)	0,91 (0,50 - 1,66)	0,77
TT	28 (23%)	33 (21%)	1,07 (0,52 - 2,20)	0,86
rs3738581				
Alelo	244	318		
C	132 (54%)	245 (77%)	1,00	
T	112 (46%)	73 (23%)	2,48 (1,94 - 4,16)	0,1x10⁻⁹
Genótipo	122	159		
CC	38 (31%)	91 (57%)	1,00	
CT	56 (46%)	63 (40%)	2,12 (1,22 - 3,71)	0,58x10⁻²
TT	28 (23%)	5 (3%)	13,17 (4,56 - 47,01)	0,9x10⁻¹⁰

5.2. SNPs no Gene *SEMA4A* x Manifestações Clínicas do LES

Além da análise da susceptibilidade dos polimorfismos do gene *SEMA4A* com LES, neste trabalho foi analisada também a possível associação destes SNPs com as manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes nas duas populações analisadas.

Na população do Sudeste brasileiro foi observada associação com distúrbios neurológicos em 3 dos SNPs estudados: SNP rs7695 com o genótipo C/T (OR = 2,55, IC = 1,04 – 6,63, $p = 0,026$), SNP rs12401473 com o genótipo C/T (OR = 2,82, IC = 1,00 – 6,15, $p = 0,038$) e SNP rs3738581 com o genótipo C/T (OR = 4,30, IC = 1,18 – 23,87, $p = 0,017$), todos indicando um fator de risco ao desenvolvimento dessa manifestação nos pacientes com LES. O SNP rs7695 indicou susceptibilidade ao desenvolvimento da síndrome do anticorpo antifosfolípido (SAAF) para o genótipo C/T (OR = 2,43, IC = 1,02 – 6,13, $p = 0,030$) e o SNP rs3738581 indicou proteção para aparecimento de alterações hematológicas para o genótipo C/C (OR = 0,30, IC = 0,07 – 0,96, $p = 0,041$) nos pacientes estudados, conforme mostrado na tabela 5.

Tabela 5. Manifestações clínicas associadas ao gene *SEMA4A* nas populações do Sudeste e Nordeste Brasileiros

Manifestação Clínica	SNP	Genótipo	Odds Ratio (95% IC)	<i>p-value</i>
População Sudeste				
Alterações Neurológicas	rs7695	CT	2,55 (1,04 – 6,63)	0,026
	rs12401473	CT	2,82 (1,00 – 6,15)	0,038
	rs3738581	CT	4,30 (1,18 – 23,87)	0,017
SAAF	rs7695	CT	2,43 (1,02 – 6,13)	0,030
Alterações Hematológicas	rs3738581	CC	0,30 (0,07 – 0,96)	0,041
População Nordeste				
Úlceras Orais	rs7695	CT	2,82 (1,02 – 8,40)	0,038
Rash Malar	rs12401473	CC	0,40 (0,15 – 1,06)	0,046

Na população do Nordeste brasileiro, as análises indicaram associação do SNP rs7695 com úlceras orais para o genótipo C/T (OR = 2,82, IC = 1,02 – 8,40, $p = 0,038$) indicando um fator de risco para o desenvolvimento dessa manifestação nos pacientes portadores desse genótipo. O SNP rs12401573 indicou proteção ao desenvolvimento de “rash” malar para os pacientes com LES portadores do genótipo C/C (OR = 0,40, IC = 0,15 – 1,06, $p = 0,046$) nessa população.

Na análise de associação das manifestações clínicas com sexo e etnia, os indivíduos descendentes de Europeus da população do Sudeste apresentaram risco aumentado para o desenvolvimento de manifestações cutâneas e hematológicas (OR = 2,73, IC = 1,21-6,35, $p = 0,008$ e OR = 2,76, IC = 1,22-6,51, $p = 0,009$), respectivamente. Nenhuma associação foi encontrada nos subgrupos restantes, como mostrado na tabela 6.

Tabela 6. Análise de associação das manifestações clínicas dos pacientes com LES do Sudeste em relação ao sexo e etnia.

Manifestações Clínicas	Etnia		Sexo	
	Caucasiano n= 120 (%)	Negro n=38 (%)	Feminino n= 147 (%)	Masculino n= 11 (%)
Alterações cutâneas	74 (61,7)¹	14 (11,7)	82 (55,8)	6 (54,5)
Fotosensibilidade	39 (32,5)	6 (5)	44 (29,9)	1 (9,1)
Artrite	54 (45)	14(11,7)	63 (42,9)	5 (45,5)
Serosite	33 (27,5)	7(5,8)	37 (25,2)	3 (27,3)
Nefrite Lúpica	64 (53,3)	23 (19,2)	80 (54,4)	7 (63,6)
Alterações Neuropsiquiátricas	26 (21,7)	4 (3,3)	28 (19)	2 (18,2)
Alterações Hematológicas	71 (59,2)²	13 (10,8)	78 (53,1)	6 (54,5)
Alterações Imunológicas	68 (56,7)	19 (15,8)	83 (56,5)	4 (36,4)
Fator positivo antinuclear (FAN)	101 (84,2)	28 (23,3)	121 (82,3)	8 (72,7)
Anticorpo anti-DNA (anti ds-DNA)	28 (23,3)	6 (5)	34 (23,1)	0 (0)
Síndrome Antifosfolípídica (APS)	40 (33,3)	12 (10)	47 (32)	5 (45,5)
Fenômeno de Raynaud	7 (5,8)	1 (0,8)	7 (4,8)	1 (9,1)

1. OR= 2,73, IC = 1,21-6,35, p -value= 0,008; 2. OR =2,76, IC = 1,22 – 6,51, p -value= 0,009

Na análise de associação das manifestações clínicas e etnia com a população do Nordeste, os indivíduos descendentes de Africanos apresentaram risco aumentado para o desenvolvimento de alterações imunológicas (OR = 7,20, IC = 1,62 - 66,53, $p = 0,003$) (Tabela 7). No que se refere à análise de manifestações clínicas em relação ao sexo, não foi possível fazer nenhuma inferência devido ao baixo número de pacientes do sexo masculino em relação aos pacientes do sexo feminino.

Tabela 7. Análise de associação das manifestações clínicas dos pacientes com LES do Nordeste em relação ao sexo e etnia.

Manifestações Clínicas	Etnia		Sexo	
	Caucasiano n= 27 (%)	Negro n= 95 (%)	Feminino n= 120 (%)	Masculino n= 2 (%)
“rash” Malar	15 (55,55)	60 (63,15)	58 (48,33)	2 (100)
“rash” Discoide	3 (11,11)	18 (18,94)	18 (15)	0 (0)
Fotossensibilidade	15 (55,55)	76 (80)	69 (57,5)	1 (50)
Artrite	18 (66,66)	73 (76,84)	72 (60)	1 (50)
Úlceras	4 (14,81)	22 (23,15)	21 (17,5)	0 (0)
Serosite	9 (33,33)	19 (20)	19 (15,33)	2 (100)
Alterações Hematológicas	20 (74,07)	65 (68,42)	63 (52,5)	2 (100)
Lúpus Nefrítico	16 (59,25)	47 (49,47)	46 (38,33)	1 (50)
Distúrbios Neurológicos	5 (18,51)	6 (6,31)	5 (4,1)	1 (50)
Alterações Imunológicas	2 (7,40)	35 (36,84)¹	35 (29,16)	0 (0)
Anticorpo Anti-DNA (anti ds-DNA)	6(22,22)	27 (28,42)	27 (22,5)	0 (0)

1. OR= 7,20, IC = 1,62 - 66,53, p -value = 0,003

5.3 Haplótipos

A análise de haplótipos indicou um desequilíbrio de ligação entre 3 Tag SNPs (rs3738582, rs12401573 e rs7695) estudados na população do Sudeste ($D'=100$) e dois Tag SNPs (rs12401573 e rs7695) na população do Nordeste ($D'=97$) como mostrado na figura 11. Entretanto, nenhuma combinação de haplótipos envolvendo os SNPs testados mostraram qualquer associação com à susceptibilidade ao LES nas populações analisadas.

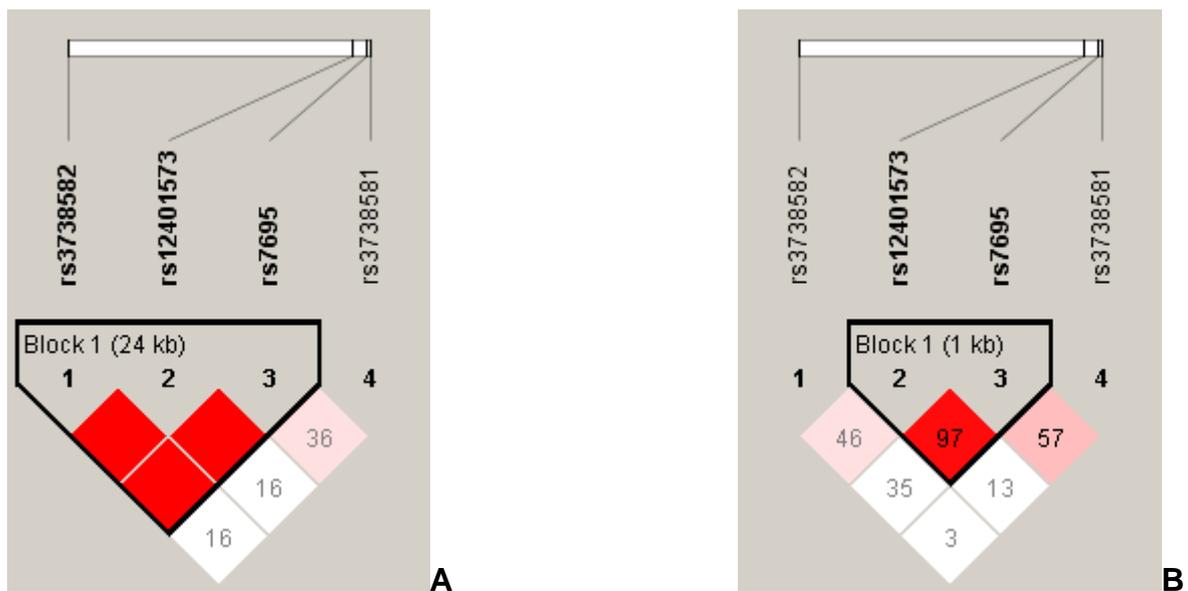


Figura 11. Posição no gene dos SNPs analisados e o desequilíbrio de ligação entre eles. A) População do Nordeste $D' = 100$. B) População do Sudeste $D' = 97$.

6. Discussão

A partir do estudo de microarranjo de Sandrin-Garcia *et al.* (2009), o gene *SEMA4A* foi selecionado como um possível candidato a estar envolvido na patogênese da doença por apresentar o perfil de expressão 32 vezes maior nos pacientes com LES ativo do que nos controles. Este gene é expresso em células dendríticas, células B e T ativadas, todas envolvidas diretamente no estabelecimento e manutenção do LES (Kumanogoh & Kikutani 2003; Vadasz & Toubi 2013).

O presente estudo mostrou que os genótipos T/T e C/T do SNP rs3738581 [C>T] próximo à região 3'UTR mostrou-se associado à doença nas duas populações estudadas. O SNP rs3738581 está localizado próximo à região não-traduzida 3' (3'UTR) do gene *SEMA4A*. Dessa forma, tal polimorfismo pode interferir na ligação de fatores que controlam a estabilidade e/ou tradução do RNA mensageiro (mRNA). A 3'UTR estende-se do códon de parada, o qual indica o término da síntese proteica, ao início da cauda poli-A, a qual protege o mRNA da degradação tornando-o estável, regulando assim a expressão gênica juntamente com outros processos. Esse conjunto de fatos levou-nos à hipótese de que a presença do SNP rs3738581, provocaria uma mudança próxima à região 3'UTR, podendo modificar a estabilidade do mRNA, alterando assim a expressão do gene como demonstrado por Sandrin-Garcia *et al.* (2009) e também a quantidade final de proteína produzida, o que poderia levar a uma descompensação da resposta inflamatória, iniciando assim o processo de desenvolvimento do LES.

Alguns estudos envolvendo a proteína Sema4A mostraram seu papel na propagação da resposta inflamatória em determinadas doenças. Estudando a

relevância patogênica da Sema4A no desenvolvimento da miocardite autoimune experimental (EAM), uma doença mediada por célula T, Makino *et al.* (2008) analisaram dois grupos de camundongos portadores da doença, sendo um modificado geneticamente para apresentar deficiência de Sema4A e outro selvagem. Os animais selvagens exibiram a EAM com infiltração significativa de células mononucleares inflamatórias. Contrariamente, os animais deficientes da proteína Sema4A mostraram um fenótipo suave da inflamação, revelando uma resistência ao desenvolvimento da doença. No trabalho de Okuno *et al.* (2011), analisou-se modelos murinos da esclerose múltipla, a encefalomielite autoimune experimental (EAE), doença também mediada por células T, e os autores constataram que a mesma pode ser amenizada por injeção intravenosa do anticorpo monoclonal anti-Sema4A, levando a uma diminuição de células mononucleares inflamatórias na medula espinhal e, conseqüentemente, a atenuação da doença.

Uma vez que o gene *SEMA4A* atua com maior intensidade no início da resposta imune e baseado nos estudos funcionais de Makino *et al.* (2008) e Okuno *et al.* (2011), podemos sugerir que elevadas concentrações da proteína Sema4A podem induzir uma resposta inflamatória exacerbada como apresentado por pacientes com LES, sendo assim, a presença do SNP rs3738581 levaria a um aumento dos níveis séricos de Sema4A contribuindo no desenvolvimento da doença.

Em relação às manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com LES estudados, na população do Sudeste, os SNPs rs7695, rs12401573 e rs3738581 (OR = 2,55; OR = 2,82; OR = 4,30, respectivamente) foram associados à distúrbios neurológicos. No LES, o sistema nervoso central dos pacientes é

frequentemente afetado, levando ao desenvolvimento de sintomas neuropsiquiátricos, como convulsões, doença cerebrovascular, miastenia gravis, bipolaridade, síndromes desmielinizantes, entre outras (Galindo & Veiga, 2010; Fortuna & Brennan, 2013). Estudos envolvendo a participação de semaforinas na patogênese dessas alterações neurológicas sugerem que essas proteínas têm papel no desenvolvimento de distúrbios neurológicos, uma vez que são abundantes no sistema nervoso central por estarem envolvidas na organogênese desse sistema e atuarem na orientação axônica (Okuno *et al.*, 2011). Considerando que Sema4a tem função imunoregulatória e que a molécula é abundante no cérebro, ele se torna um alvo em potencial para a intervenção na resposta imune dos pacientes com LES que apresentam manifestações neurológicas e certamente merece atenção em relação à sua função na patogênese da doença. Dessa forma, podemos sugerir que elevadas concentrações de Sema4A poderiam influenciar na ocorrência dos distúrbios neuropsiquiátricos, amplificando de forma exacerbada os sintomas no sistema neurológico desses pacientes.

Alterações hematológicas e SAAF também foram associadas aos SNPs rs3738581 e rs7695 na população do Sudeste, respectivamente. Entretanto, não existem na literatura, até o momento, informações sobre o envolvimento do *SEMA4A* com tais alterações.

Na população do Nordeste os SNPs rs7695 e rs12401573 foram associados, respectivamente, à susceptibilidade com úlceras orais (OR = 2,82) e proteção ao aparecimento de “rash” malar (OR = 0,40). Alterações cutâneas aparecem em cerca de 85% dos indivíduos acometidos pelo LES, e muitas delas se desenvolvem em áreas do corpo expostas ao sol (Cojocarú *et al.*, 2011).

Segundo o estudo de Vilar e Sato (2002), realizado também no Nordeste, as manifestações clínicas mais frequentes foram as cutâneas (90,2%), uma vez que essa região recebe altas taxas de raios ultravioleta. O SNP rs12401573 apresentou proteção ao “rash” malar para o genótipo CC (OR = 0,40), indicando que pacientes que não possuem o alelo T têm menos chance de desenvolver tal manifestação. Sendo o Nordeste brasileiro uma região que recebe altas taxas de raios ultravioletas e a exposição solar um dos fatores que ajudam a desencadear a doença, as associações encontradas no presente estudo estão em concordância com a literatura.

Em relação à análise de manifestações clínicas, etnia e gênero na população do Sudeste, os pacientes com ascendência Europeia apresentaram risco aumentado para alterações cutâneas e hematológicas em relação aos pacientes com ascendência Africana. A melanina funciona como um filtro óptico natural protegendo as células específicas da epiderme contra os efeitos da radiação UV, e uma vez que os indivíduos com ascendência europeia apresentam menos melanina que os indivíduos com ascendência africana, pode-se justificar assim a associação encontrada (Böhm *et al.*, 2005).

Esse é o primeiro estudo de associação envolvendo o gene *SEMA4A* e a susceptibilidade ao LES e às suas manifestações. Os resultados encontrados nos levam a propor que o *SEMA4A* é um gene candidato relevante no desenvolvimento do LES e na regulação do desenvolvimento de manifestações neurológicas nesses pacientes, podendo até de acordo com o risco estabelecido (OR = 13,17) ser um possível marcador molecular. Além disso, como o gene *SEMA4A* apresenta importante função regulatória no sistema imune ele pode se tornar um gene alvo na patogênese de outras doenças autoimunes além do LES.

7. Conclusões

1. Neste estudo foi observada associação do SNP rs3738581 do gene *SEMA4A* à susceptibilidade ao LES tanto no Sudeste quanto no Nordeste do Brasil.
2. Foi observada a associação dos polimorfismos do *SEMA4A* às seguintes manifestações clínicas: na população do Sudeste foi observada a associação com aumento de risco ao desenvolvimento de alterações neurológicas com 3 SNPs estudados (rs7696, rs12401573 e rs3738581), indicando que esses SNPs possam ser potenciais marcadores para esse tipo de manifestação. Ainda, foram observadas associações com a SAAF (rs7695) e alterações hematológicas (rs3738581). Na população do Nordeste foi observada susceptibilidade ao desenvolvimento de úlceras orais (rs7696) e proteção ao aparecimento de “rash” malar (rs12401573).
3. A análise de manifestações clínicas relacionadas à etnia e ao gênero na população do Sudeste indicou que pacientes com ascendência Europeia têm risco aumentado para alterações cutâneas e hematológicas em relação aos pacientes com ascendência Africana.
4. A análise de manifestações clínicas com etnia na população do Nordeste mostrou que pacientes com ascendência Africana apresentam risco aumentado para alterações imunológicas em relação aos pacientes com ascendência Europeia.
5. O gene *SEMA4A* é um forte gene candidato na patogênese do LES e das suas manifestações clínicas, principalmente neurológicas.

8. Referências Bibliográficas

- Abbas A, Lichtman A and Pillai S (2008) *Imunologia Celular e Molecular* (7th ed.). Rio de Janeiro: Elsevier.
- Abid A, Ismail M, Mehdi SQ and Khaliq S (2006) Identification of novel mutations in the *SEMA4A* gene associated with retinal degenerative diseases. *Journal of medical genetics*, 43(4), 378–81. doi:10.1136/jmg.2005.035055
- Alcocer-Varela J and Alarcón-Segovia D (1982) Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation*, 69(6), 1388–92. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=370212&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Aparecida V, Mana M, Leite CA, Karolina L, Arruda A (2013) Avaliação da qualidade de vida em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico atendidos no hospital universitário em Mato Grosso – Brasil. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, 36(11), 50–56.
- Apostolidis SA, Lieberman LA, Kis-Toth K, Crispín JC and Tsokos GC (2011) The dysregulation of cytokine networks in systemic lupus erythematosus. *Journal of interferon & cytokine research* : the oficial journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, 31(10), 769–79. doi:10.1089/jir.2011.0029
- Assis MR and Baaklini CE (2009) Como Diagnosticar e Tratar Lúpus eritematoso sistêmico. *Revista Brasileira de Medicina*.
- Böhm M, Wolff I, Scholzen TE, Robinson SJ, Healy E, Luger TA, et al. (2005) alpha-Melanocyte-stimulating hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. *The Journal of biological chemistry*. 18;280(7):5795–802.
- Borchers AT, Naguwa SM, Shoenfeld Y and Gershwin ME (2010) The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews*, 9(5), A277–87. doi:10.1016/j.autrev.2009.12.008
- Chavele KM and Ehrenstein MR (2011) Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS letters*, 585(23), 3603–10. doi:10.1016/j.febslet.2011.07.043
- Choi J, Kim ST and Craft J (2012) The pathogenesis of systemic lupus erythematosus-an update. *Current opinion in immunology*, 24(6), 651–7. doi:10.1016/j.coi.2012.10.004

- Cojocaru M, Cojocaru I, Silosi I and Vrabie C (2011) Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatic diseases clinics of North America*, 6(4), 330–336. doi:10.1016/j.rdc.2013.10.003
- Crispín JC, Liossis SN, Kis-Toth K, Lieberman LA, Kyttaris VC, Juang YT and Tsokos GC (2010) Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends in molecular medicine*, 16(2), 47–57. doi:10.1016/j.molmed.2009.12.005
- Danchenko N, Satia J and Anthony M (2006) Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus*, 15(5), 308–318. doi:10.1191/0961203306lu2305xx
- Deng Y and Tsao BP (2010) Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nature reviews. Rheumatology*, 6(12), 683–92. doi:10.1038/nrrheum.2010.176
- Diniz-da-Costa T, Centeno M, Pinto L, Marques A, and Mendes-Graça L (2012) Lupus Eritematoso Sistémico e Gravidez. *Revista Científica da Ordem dos Médicos*, 25(6), 448–453.
- Fortuna G and Brennan MT (2013) Systemic lupus erythematosus: epidemiology, pathophysiology, manifestations, and management. *Dental clinics of North America*, 57(4), 631–55. doi:10.1016/j.cden.2013.06.003
- Galindo, C. V. F., & Veiga, R. K. A. (2010). Clinical and diagnostic features of systemic lupus. *Revista Eletrônica de Farmácia*, VII(4), 46–58.
- Graham RR, Kyogoku C, Sigurdsson S, Vlasova IA, Davies LR, Baechler EC, Plenge RM, Koeuth T, Ortmann WA, Hom G, Bauer JW, Gillett C, Burt N, Cunninghame Graham DS, Onofrio R, Petri M, Gunnarsson I, Svenungsson E, Rönnblom L, Nordmark G *et al.*, (2007) *Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus. Proc Natl Acad Sci U S A 104:6758-63.*
- Hochberg MC (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 40(9), 1725.
- Huemer C, Huemer M, Dorner T, Falger J, Schacherl H, Bernecker M, Artacker G *et al.* (2001) Incidence of pediatric rheumatic diseases in a regional population in Austria. *The Journal of rheumatology*, 28(9), 2116–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11550984>
- Jakes RW, Bae SC, Louthrenoo W, Mok CC, Navarra SV and Kwon N (2012) Systematic review of the epidemiology of systemic lupus erythematosus in the Asia-Pacific region: prevalence, incidence, clinical features, and mortality. *Arthritis care & research*, 64(2), 159–68. doi:10.1002/acr.20683

- Kampylafka E, Alexopoulos H, Kosmidis ML, Panagiotakos DB, Vlachoyiannopoulos PG, Dalakas MC, Moutsopoulos HM, *et al.* (2013) Incidence and prevalence of major central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus: a 3-year prospective study of 370 patients. *PloS one*, 8(2), e55843. doi:10.1371/journal.pone.0055843
- Kandala NB, Connock M, Grove A, Sutcliffe P, Mohiuddin S, Hartley L, Court R, *et al.* (2013) Belimumab: a technological advance for systemic lupus erythematosus patients? Report of a systematic review and meta-analysis. *BMJ open*, 3(7), 1–12. doi:10.1136/bmjopen-2013-002852
- Kumanogoh A and Kikutani H (2013) Immunological functions of the neuropilins and plexins as receptors for semaphorins.
- Kumanogoh A and Kikutani H (2003) Immune semaphorins: a new area of semaphorin research. *Journal of cell science*, 116(Pt 17), 3463–70. doi:10.1242/jcs.00674
- Kumanogoh A, Marukawa S, Suzuki K, Takegahara N, Watanabe C, Ishida I, *et al.* (2002) Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature*, 419(6907), 629–33. doi:10.1038/nature01037
- Kyttaris VC (2010) Systemic Lupus Erythematosus: From Genes to Organ Damage. (Q. Yan, Ed.), 662. doi:10.1007/978-1-60761-800-3
- Lieberman LA and Tsokos GC (2010) The IL-2 defect in systemic lupus erythematosus disease has an expansive effect on host immunity. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, 740619. doi:10.1155/2010/740619
- Linder G, Chuntova P, McLelland B, Añó L, Obodo U, Crider N, Matthes D *et al.* (2013) Semaphorin 4A is dynamically regulated during thymocyte development in mice. *Cellular Immunology*, 150(2), 150 – 158.
- Lockshin MD (2008) Systemic lupus erythematosus. ACP Medicine, seção 15, capítulo 4. WebMD.
- Makino N, Toyofuku T, Takegahara N, Takamatsu H, Okuno T, Nakagawa Y, Kang S, *et al.* (2008) Involvement of Sema4A in the progression of experimental autoimmune myocarditis. *FEBS letters*, 582(28), 3935–40. doi:10.1016/j.febslet.2008.10.040
- Mathian A, Arnaud L and Amoura Z (2013) Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus: A 2014 update. *La Revue de medecine interne / fondee ... par la Societe nationale francaise de medecine interne*. doi:10.1016/j.revmed.2013.10.334
- Nakashima K, Galhardo AP, Ferreira J, Fiorenzano GR, Bozzo A, Fernando M, *et al.* (2011) Incidência e aspectos clínico-laboratorias do lúpus eritematoso sistêmico em cidade do Sul do Brasil, 51(3), 235–239.

- Nalbandian A, Crispín JC and Tsokos GC (2009) Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. *Clinical and experimental immunology*, 157(2), 209–15. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03944.x
- Nasonov E, Soloviev S, Davidson J, Lila A, Ivanova R, Togizbayev G, Omarbekova Z *et al.* (2014) The prevalence and incidence of Systemic Lupus Erythematosus (SLE) in selected cities from three Commonwealth of Independent States countries (the Russian Federation, Ukraine and Kazakhstan). *Lupus*, 23(2), 213–9. doi:10.1177/0961203313512881
- Niewold TB, Adler JE, Glenn SB, Lehman TJA, Harley JB and Crow MK (2008) Age- and Sex-Related Patterns of Serum Interferon- α Activity in Lupus Families. *Arthritis Rheum.*, 58(7), 2113–2119. doi:10.1002/art.23619.Age-
- Niewold TB, Hua J, Lehman TJA, Harley JB and Crow MK (2007) High serum IFN- α activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*, 8(6), 492–502. doi:10.1038/sj.gene.6364408.High
- Nkyimbeng-Takwi E, Shanks K, Smith E, Iyer A, Lipsky M, Detolla LJ, Kikutani H *et al.* (2012) Neuroimmune semaphorin 4A downregulates the severity of allergic response. *Mucosal Immunol*, 5(4), 409–419. doi:10.1038/mi.2012.18.Neuroimmune
- Okuno T, Nakatsuji Y and Kumanogoh A (2011) The role of immune semaphorins in multiple sclerosis. *FEBS letters*, 585(23), 3829–35. doi:10.1016/j.febslet.2011.03.033
- Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L and Cooper GS (2010) Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 39(4), 257–68. doi:10.1016/j.semarthrit.2008.10.007
- Radic M, Martinovic KD and Radic J (2013) Vascular manifestations of systemic lupus erythematosus. *The Netherlands journal of medicine*, 71(1), 10–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23412817>
- Rastin M, Mahmoudi M, Hatef M, Sahebari M, Tabasi N, Haghmorad D, Nosratabadi R *et al.* (2013) T lymphocyte apoptosis in systemic lupus erythematosus patients. *Iranian journal of basic medical sciences*, 16(8), 936–41. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3786107&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W and Khamashta MA (2010) Antiphospholipid syndrome. *Lancet*, 376(9751), 1498–509. doi:10.1016/S0140-6736(10)60709-X
- Sambrook J, Fritsch EF, M. T. M. cloning (1989) A laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Seitz H and Matsushima GK (2010) Dendritic Cells in Systemic Lupus Erythematosus Heather. *Int Rev Immunol*, 29(2), 1–21. doi:10.3109/08830181003602507.Dendritic
- Semaphorin Nomenclature Committee. (1999). Unified Nomenclature for the. *Cell*, 97, 551–552.
- Smith EP, Shanks K, Lipsky MM, DeTolla LJ, Keegan AD and Chapoval SP (2011) Expression of neuroimmune semaphorins 4A and 4D and their receptors in the lung is enhanced by allergen and vascular endothelial growth factor. *BMC immunology*, 12(1), 30. doi:10.1186/1471-2172-12-30
- Taylor KE, Chung S, Graham RR, Ortmann W, Lee AT, Langefeld CD, Jacob CO *et al.* (2011) Risk alleles for systemic lupus erythematosus in a large case-control collection and associations with clinical subphenotypes. *PLoS genetics*, 7(2), e1001311. doi:10.1371/journal.pgen.1001311
- Tiffin N, Adeyemo A and Okpechi I (2013) A diverse array of genetic factors contribute to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Orphanet journal of rare diseases*, 8, 2. doi:10.1186/1750-1172-8-2
- Tobón GJ, Izquierdo JH and Cañas CA (2013) B Lymphocytes: Development, Tolerance, and Their Role in Autoimmunity-Focus on Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmune diseases*, 2013, 827254. doi:10.1155/2013/827254
- Tsao BP (2003) The genetics of human systemic lupus erythematosus. *Trends in Immunology*, 24(11), 595–602. doi:10.1016/j.it.2003.09.006
- Tsokos GC (2011) Systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine*, 365(22), 2110–21. doi:10.1056/NEJMra1100359
- Uva L, Miguel D, Pinheiro C, Freitas JP, Marques GM and Filipe P (2012) Cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. *Autoimmune diseases*, 2012(Figure 1), 834291. doi:10.1155/2012/834291
- Vadasz Z and Toubi E (2013) Semaphorins: Their Dual Role in Regulating Immune-Mediated Diseases. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 72. doi:10.1007/s12016-013-8360-4
- Vilar M and Sato E (2002) Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus*, 11(8), 528–532. doi:10.1191/0961203302lu244xx
- Yang J, Chu Y, Yang X, Gao D, Zhu L, Yang X, Wan L *et al.* (2009) Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, 60(5), 1472–83. doi:10.1002/art.24499

- Yu HH and Kolodkin AL (1999) Semaphorin signaling: a little less per-plexin. *Neuron*, 22(1), 11–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10027283>
- 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. *Clinical & developmental immunology*, 2012, 715190. doi:10.1155/2012/715190
- Yurasov S, Tiller T, Tsuiji M, Velinzon K, Pascual V, Wardemann H and Nussenzweig MC (2006) Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *The Journal of experimental medicine*, 203(10), 2255–61. doi:10.1084/jem.20061446
- Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V and Nussenzweig MC (2005) Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *The Journal of experimental medicine*, 201(5), 703–11. doi:10.1084/jem.20042251
- Zenewicz LA, Abraham C, Flavell RA and Cho JH (2010) Unraveling the genetics of autoimmunity. *Cell*, 140(6), 791–7. doi:10.1016/j.cell.2010.03.003
- Zou YF, Feng CC, Zhu JM, Tao JH, Chen GM, Ye QL, Cen H, Leng RX, Pan FM *et al.* (2013) Prevalence of systemic lupus erythematosus and risk factors in rural areas of Anhui Province. *Rheumatol Int.* doi:10.1007/s00296-013-2902-1

9. Curriculum vitae (Lattes)

Dados pessoais

Nome Vanessa Garcia Germoglio
Filiação MÁRIO GERMOGLIO FILHO e MARIA DO SOCORRO GARCIA GERMOGLIO
Nascimento 01/01/1990 - JOÃO PESSOA/PB - Brasil

Endereço residencial R. Sidney Clemente Dore.
Tambaú - Joao Pessoa
58039-230, PB - Brasil
Telefone: 83 91033759

Formação acadêmica/titulação

- 2012** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: GENE *SEMA4A* (SEMAPHORIN 4A): ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO COM SUSCEPTIBILIDADE AO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO
Orientador: Paula Sandrin Garcia
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
- 2008 - 2011** Graduação em Biomedicina.
Faculdade Santa Emília de Rodat, FASER, Joao Pessoa, Brasil
Título: *Helicobacter pylori*: comparação entre métodos diagnósticos histopatológico, teste da urease e reação em cadeia da polimerase
Orientador: Nathália de Alencar Cunha Tavares

Formação complementar

- 2011 - 2011** Habilitação em Biologia Molecular.
Faculdade Santa Emília de Rodat, FASER, Joao Pessoa, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em III CURSO DE INVERNO DE GENÉTICA - UFPR.
Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em MÉTODOS MOLECULARES APLICADOS AO ESTUDO DOS TUMORES.
Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Sao Luis, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Sequenciamento: Metodologias Tradicionais e Modern.
Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, Brasil
- 2008 - 2008** Extensão universitária em II CURSO DE EXTENSÃO EM HISTOPATOLOGIA.
Faculdade Santa Emília de Rodat, FASER, Joao Pessoa, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em CITOPATOLOGIA.
Faculdade Santa Emília de Rodat, FASER, Joao Pessoa, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2012 - 2014 Vínculo: Mestranda , Enquadramento funcional: Mestrado , Carga horária: 30, Regime: Dedicção exclusiva

Áreas de atuação

1. Genética Humana e Médica
2. Análises Clínicas

Projetos

Projetos de pesquisa
2012 - Atual GENE *SEMA4A* (SEMAPHORIN 4A): ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO COM SUSCEPTIBILIDADE AO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Descrição: O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune que afeta diversos órgãos e sistemas. Vários fatores estão implicados no desencadeamento da doença como genéticos, ambientais, hormonais e imunológicos. O presente projeto tem por objetivo testar a associação de polimorfismos (SNPs) no gene *Sema4A* com a predisposição ao LES em pacientes brasileiros. Essa abordagem é uma consequência natural do projeto desenvolvido pela orientadora do atual projeto, Dra Paula Sandrin Garcia, que em estudo anterior, analisou a expressão gênica diferencial em larga escala, por meio de microarrays, em pacientes portadores de lúpus e indivíduos controle. Diversos genes se apresentaram diferencialmente expressos nos pacientes com lúpus, sendo que dentre estes, o gene aqui proposto, foi considerado candidato à predisposição à condição patológica, podendo estar diretamente envolvido nas funções do processo de desencadeamento da doença. *Sema4A* é preferencialmente expressa em células B e células dendríticas e está envolvida na ativação de células T, regulando a resposta imune mediada por células T. As semaforinas imunes, da qual *Sema4A* faz parte, têm atividades biológicas distintas em diferentes fases de respostas imunes, sendo responsáveis pela manutenção da homeostase imunológica através da regulação e coordenação de sistemas de comunicação imune celular. De acordo com a sua função na regulação da resposta imune, podem estar patologicamente envolvidas em várias doenças autoimunes. A identificação de polimorfismos em genes envolvidos na susceptibilidade ao LES é, atualmente, uma das mais importantes linhas de pesquisa que visa entender como a autoimunidade progride e quais as suas causas. As tecnologias que permitem a detecção de SNPs (Polimorfismos de Base Única) têm ganhado um amplo destaque a partir da conclusão do Projeto Genoma Humano. Os SNPs são a maior fonte de variações genéticas interindividuais e têm sido utilizados para identificar polimorfismos gênicos na predisposição

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Vanessa Garcia Germoglio (Responsável); ;

Financiador(es): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

Português Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Prêmios e títulos

2011 Lâurea universitária no curso de Biomedicina, Faculdade Santa Emília de Rodat

Produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **GERMOGLIO, V. G.**

Influência do Polimorfismo no Gene da Proteína Recaptadora de Serotonina e a Predisposição para a Depressão In: III Curso de Inverno de Genética da UFPR, 2010, Curitiba.

III Curso de Inverno de Genética da UFPR. , 2010.

2. **GERMOGLIO, V. G.**

Lúpus Eritematoso Sistêmico e Gravidez In: 4ª Jornada Científica da FASER, 2009, João Pessoa.

4ª Jornada de Iniciação Científica. , 2009.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **GERMOGLIO, V. G.**

Influência do Polimorfismo no Gene da Proteína Recaptadora de Serotonina e a Predisposição para a Depressão, 2010. (Outra,Apresentação de Trabalho)

2. **GERMOGLIO, V. G.**

Influência do Polimorfismo no Gene da Proteína Recaptadora de Serotonina e a Predisposição para a Depressão, 2010. (Outra,Apresentação de Trabalho)

3. **GERMOGLIO, V. G.**

LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E GRAVIDEZ, 2008. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **GERMOGLIO, V. G.**

Colágeno, 2009. (Maquete)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação Oral no(a) **VII JORNADA CIENTÍFICA DA FASER**, 2010. (Outra)

Influência do Polimorfismo no Gene da Proteína Recaptadora de Serotonina e a Predisposição para a Depressão.

2. **Atuação do Biomédico em Citopatologia**, 2010. (Outra)

3. **III JORNADA CIENTÍCA DA FASER**, 2008. (Outra)
FERTILIZAÇÃO.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **IV JORNADA CIENTÍCA DA FASER**, 2008. (Outra)
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E GRAVIDEZ.

5. **Alterações Citoplasmáticas e Nucleares Provocadas por Infecções no Trato Genital Feminino**, 2008. (Outra)

.

6. **III Simpósio de Biomedicina: Tecnologia a Serviço da Vida**, 2008. (Simpósio)

.

7. **Resistência Bacteriana por Bombas de Efluxo: Como Revertê-las**, 2008. (Outra)

.

8. **Fertilização**, 2008. (Outra)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos.....	2
Apresentações de trabalhos (Outra).....	3

Produção técnica

Maquete.....	1
.....	

Eventos

Participações em eventos (simpósio).....	1
Participações em eventos (outra).....	7

Outras informações relevantes

1 Monitora de Histologia 2009.1 e 2009.2
Monitora de Genética Molecular 2010.1 e 2010.2