

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

**GEÍSA BELTRÃO DOS REIS VIANA**

**ASSOCIAÇÃO ALÉLICA DO GENE HLA-DRB1\* COM LÚPUS ERITEMATOSO  
SISTÊMICO EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO DO NORDESTE DO BRASIL**

São Luís  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**GEÍSA BELTRÃO DOS REIS VIANA**

**ASSOCIAÇÃO ALÉLICA DO GENE HLA-DRB1\* COM LÚPUS ERITEMATOSO  
SISTÊMICO EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO DO NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Emygdia Rosa do Rego Barros Pires Leal Mesquita

São Luís  
2010

Viana, Geísa Beltrão dos Reis.

Associação alélica do gene HLA-DRB1\* com Lúpus Eritematoso Sistêmico em um hospital terciário do nordeste do Brasil. /

Geísa Beltrão dos Reis Viana. --- São Luís, 2010.

Orientadora: Emygdia Rosa do Rego Barros Pires Leal Mesquita.  
69 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Maranhão, 2010.

1. Lúpus eritematoso sistêmico. 2. Gene HLA-DRB1 – Associação. I. Título.

CDU: 616.5-002.52(812.1)

**GEÍSA BELTRÃO DOS REIS VIANA**

**ASSOCIAÇÃO ALÉLICA DO GENE HLA-DRB1\* COM LÚPUS ERITEMATOSO  
SISTÊMICO EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO DO NORDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Mestrado da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Emygdia Rosa do Rego Barros Pires Leal Mesquita**  
Doutora em Genética Molecular Humana  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Tereza Lobato Borges**  
Doutora em Reumatologia  
Centro Unificado do Maranhão

---

**Prof. Dr. Vinícius José da Silva Nina**  
Doutor em Medicina  
Universidade Federal do Maranhão

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alcione Miranda dos Santos**  
Doutora em Engenharia de Produção  
Universidade Federal do Maranhão

A meus pais, Washington Luís  
e Odette, e a meus filhos, Luciano e Gabriel, bênçãos  
divinas incomensuráveis.

A minha avó Evilásia Castro dos Reis (*in memoriam*), por  
todo seu desvelo, generosidade e amor.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, Luz e Força constantes na minha vida.

A Nossa Senhora, Maria de Nazaré, companheira do meu viver, a quem o Mestrado foi consagrado quando era apenas um projeto.

A meu esposo Luiz Henrique, por todo o apoio ao longo de mais esta jornada acadêmica.

A minha irmã Leila de Jesus, espelho para a minha vida estudantil, pelo grande incentivo.

À Prof. Dra. Emygdia Rosa Leal Mesquita, por sua confiança, amizade e estímulo, decisivos para o meu ingresso no Mestrado, e pelas relevantes informações técnicas e científicas.

À Profa. Dra. Alcione Miranda dos Santos, pelas importantes sugestões na qualificação e por demonstrar, a nós alunos, a significância da Estatística às pesquisas em saúde.

Aos professores dos Programas de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e em Saúde Coletiva, pelos valiosos ensinamentos. De modo especial, ao Prof. Dr. Antônio Augusto M. da Silva, pelas sugestões iniciais à metodologia e à Prof. Dra. Flavia Raquel Nascimento, pelas importantes contribuições por ocasião da qualificação.

Às secretárias dos Programas de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Saúde Coletiva, Ana Lúcia Cordeiro e Maria de Jesus Meneses, pela disposição em colaborar, sempre que solicitadas.

Aos colegas da turma, em especial a Maria Inês Oliveira, Laura Andrade e Consuelo Penha.

À Diretora Adjunta de Serviços Assistenciais do HUUFMA, Dra. Osires Couto, cujo apoio e “torcida” foram essenciais para o término deste estudo.

Aos atendentes do ambulatório de Reumatologia, Geusa Brito e Kleber, e de Nefrologia, Rosália Conceição e Denise Diniz, pelo auxílio administrativo quando das coletas ambulatoriais.

Aos profissionais que, de forma magnânima, participaram das coletas de sangue, Marinês de Jesus, Mary, Pontes, Almir Rodrigues, Emanuel Catarino, Patrícia Carvalho, Luíza Elane Moura, Janaína de Jesus Câmara, Roberta Luz, Maria de Fátima Galvão e Roxana Veras.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico do HUUFMA, Joelkin Campelo, Paulo Lúcia Nascimento e Luís, pelas sucessivas buscas aos prontuários.

A bibliotecária do HUUFMA, Telma Amaral, por colaborar prontamente na obtenção de artigos científicos

Às assistentes sociais do HUUFMA, Maria Góis Machado, Cléa Maria Penha, Gisele Pereira, Lúcia de Fátima Lima, Adriana Carla Silva, Loide Gomes e Elisa Maria Carvalho, pelo apoio e incentivo.

Às “meninas” do HU: nutricionista Maria Gorete Batista, terapeuta ocupacional Milady Cutrim e enfermeiras Elisângela Milhomem, Gisele Andrade, Joana Carvalho e Josélia Diniz, por demonstrarem especial interesse neste estudo e por seu incentivo constante.

Aos colegas do Laboratório de Estudos Genômicos e Histocompatibilidade (LEGH), Maxwellen Ferreira, Leidiane Guimarães, Carolina Malcher, Ellen Caroline, Patrícia, Max Diego Cruz, Rita Carvalhal, Marcelo Andrade, Fabiano, Fernanda Carvalho, Cícero Lima, Patrícia Ribeiro e em especial a Fábio França, Bruno Nunes e Fernando José Brito.

Aos funcionários do HUUFMA e aos acompanhantes que se interessaram pelo trabalho e, gentilmente, se dispuseram a participar como integrantes do grupo controle.

Por fim, de uma forma especial, aos pacientes, bravos combatentes pela vida, que, apesar de todas as dificuldades inerentes à doença, aceitaram participar deste estudo.



*“Os barcos estão seguros se permanecem no porto, mas não foram feitos para isso”.*

*“Tudo é do Pai, toda honra e toda glória. É dEle a vitória alcançada em minha vida...”*

## RESUMO

Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune, multissistêmica, clinicamente heterogênea, cuja etiologia, ainda ignorada, envolve fatores hormonais, ambientais e genéticos. Genes polimórficos componentes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) têm sido associados à susceptibilidade para o LES, em diferentes populações. Os objetivos do presente estudo foram: analisar a associação do gene HLA-DRB1\* com o LES e descrever dados demográficos da amostra. Realizou-se um estudo caso-controle com 80 pacientes. Para cada caso, tomou-se um controle pareado por sexo, ambos nascidos no Estado do Maranhão. Dados demográficos foram coletados por meio de revisão de prontuários e preenchimento de formulário. Para tipificação alélica, utilizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase – Oligonucleotídeo Sequência Específica (PCR-SSO). Características demográficas dos pacientes foram: 90% eram mulheres; a idade média foi 29,91±8,64 anos e idade média ao diagnóstico foi 25,06±8,50 anos; 21,6% referiram familiares com LES e 23,8%, o grupo étnico negro. O alelo HLA-DRB1\*15 foi mais frequente no grupo de pacientes que nos controles [(18,12% versus 6,25%) OR=3,98 IC95%(1,68–9,93) p=0,0005]. Os alelos HLA-DRB1\*03 e HLA-DRB1\*08 apresentaram frequência maior entre os pacientes, porém não houve significância estatística [(11,25% versus 6,88%) OR=1,82 IC95%(0,74–4,60)] e [(11,88% versus 5,62%) OR=2,45 IC95%(0,96–6,61)], respectivamente. Os alelos HLA-DRB1\*01 e HLA-DRB1\*04 foram menos frequentes no grupo LES que entre os controles [(3,75% versus 15,00%) OR=0,18 IC95%(0,59–0,52) p=0,0003] e [(8,12% versus 15,62%) OR=0,42 IC95%(0,18–0,96) p=0,0258]. Os resultados foram condizentes com estudos anteriores em grupos populacionais distintos e sugerem que o alelo HLA-DRB1\*15 foi fator de risco para o LES e que os alelos HLA-DRB1\*01 e HLA-DRB1\*04 foram fatores de proteção, na amostra estudada.

Palavras-chave: Lúpus Eritematoso Sistêmico. Gene HLA-DRB1\*. Estudo de Associação.

## ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune, multisystem, clinically heterogeneous disease, which etiology is unknown and involves a complex interaction of genetic, hormonal and environmental factors. Genetic polymorphisms of Major Histocompatibility Complex (MHC) commonly have been associated with susceptibility to LES in different populations around the world. The aim of the present study was to investigate the association of HLA-DRB1\* gene with lupus. We studied 80 patients and 80 controls, matched for sex, from Maranhão State, Brazil. A specific questionnaire and review of medical records were used to obtain demographic data. Genotyping of HLA-DRB1\* was performed by polymerase chain reaction with sequence-specific oligonucleotide probes (PCR-SSOP). Patient demographic characteristics were: 90% were woman; 21,6% answered to have a member of family with SLE and 23% classified themselves as black; mean age was 29,91±8,64 years and mean age at diagnosis was 25,06±8,50 years. HLA-DRB1\*15 allele frequency was higher in SLE patients compared to the control group [(18.12% versus 6.25%) OR=3.98 CI95%(1.68–9.93) p=0.0005]. Two alleles were over-represented in patients group compared to the controls, but the difference did not reach statistical significance: HLA-DRB1\*03 [(11.25% versus 6.88%) OR=1.82 CI95%(0.74–4.60) p=0.1508] and HLA-DRB1\*08 [(11.88% versus 5.62%) OR=2.45 CI95%(0.96–6.61) p=0.0375]. The frequency of the alleles HLA-DRB1\*01 [(3.75% versus 15.00%) OR=0.18 CI95%(0.59–0.52) p=0.0003] and HLA-DRB1\*04 [(8.12% versus 15.62%) OR=0.42 CI95%(0.18–0.96) p=0.0258] were both lower in SLE patients compared to the control group. The findings of this study were consistent with previous data in other populations. They suggest that the HLA-DRB1\*15 allele is a risk factor for SLE, while the HLA-DRB1\*01 e HLA-DRB1\*04 alleles are protective.

**Keywords:** Systemic Lupus Erythematosus. Gene HLA-DRB1\*. Association study.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA - ASPECTOS GENÉTICOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Geral.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Específicos.....</b>	<b>27</b>
<b>4.</b>	<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>28</b>
	<b>Abstract.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2</b>	<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>33</b>
<i>4.2.1</i>	<i>Amostra em estudo.....</i>	<i>33</i>
<i>4.2.2</i>	<i>Dados demográficos.....</i>	<i>33</i>
<i>4.2.3</i>	<i>Análise Molecular.....</i>	<i>34</i>
<i>4.2.4</i>	<i>Análise Estatística.....</i>	<i>34</i>
<b>4.3</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>36</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>42</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	p.
Figura 1 Eritema malar.....	16
Figura 2 Eritema malar descamativo difuso.....	16
Figura 3 Lesão discóide.....	16
Figura 4 Mão e raios-X com artropatia erosiva.....	16
Figura 5 Organização genômica do Complexo HLA Estendido.....	18
Figura 6 Estrutura das moléculas HLA Classe I e Classe II.....	19

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

		p.
Quadro 1	Critérios de classificação do LES propostos pelo American College of Rheumatology em 1982 e revisados em 1997.....	15
Tabela 1	Frequência dos dados demográficos no grupo de pacientes com LES e no grupo controle. São Luís, Maranhão, 2010.....	47
Tabela 2	Frequência de familiares com LES segundo relato dos pacientes. São Luís, Maranhão, 2010.....	48
Tabela 3	Frequência alélica para o loco HLA-DRB1* nos pacientes com LES e nos controles, São Luís, Maranhão, 2010.....	49

## LISTA DE ABREVEATURA E SIGLAS

Anti-DNA	Anticorpo anti-DNA nativo
Anti-RNP	Anticorpo Antiproteína P-Ribossomal
Anti-Sm	Anticorpo Anti-Smith
CI	Confidencial Interval
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
HLA	<i>Human Leucocitary Antigen</i> - Antígeno Leucocitário Humano
IC	Intervalo de Confiança
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Kb	Quilobases
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MA	Maranhão
OR	Odds Ratio
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase
SLE	<i>Systemic Lupus Erythematosus</i>
SSOP	<i>Sequence Specific Oligonucleotides Probes</i> – Sondas de Oligonucleotídios de Sequências Específicas
Vs	versus

## 1. INTRODUÇÃO

Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença crônica, autoimune, severa, marcada por períodos de exacerbações e remissões (BORBA et al., 2008). Clinicamente muito heterogênea, pode afetar diferentes sistemas orgânicos, apresentado entre suas manifestações mais comuns: artralgia, fadiga e eritema. Determinados indivíduos, porém, podem desenvolver complicações sérias devido ao envolvimento renal, neurológico ou cardiopulmonar (FERNANDO et al., 2008).

O diagnóstico do LES é efetuado utilizando-se critérios de classificação propostos pelo American College of Rheumatology em 1982 e revisados em 1997 (Quadro 1). O diagnóstico fundamenta-se na presença de pelo menos quatro dos 11 critérios descritos (HONCHBERG, 1997; BORBA et al., 2008).

### QUADRO 1 – CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO, PROPOSTOS PELO AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY EM 1982 E REVISADOS EM 1997.

1. **Eritema Malar:** lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo (Figuras 1 e 2)
2. **Lesão Discoide:** lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia (Figura 3).
3. **Fotossensibilidade:** exantema cutâneo como reação não-usual à exposição solar, de acordo com história do paciente ou observado pelo médico.
4. **Úlceras orais ou nasais:** úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente indolores observadas pelo médico.
5. **Artrite:** não-erosiva, envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor, edema ou derrame articular (Figura 4).
6. **Serosite:** pleuris (caracterizada por historia convincente de dor pleurítica, atrito auscultado pelo médico ou evidencia de derrame pleural) ou pericardite (documentado por eletrocardiograma, atrito ou evidencia de derrame pericárdico).
7. **Comprometimento renal:** proteinúria persistente ( $> 0,5$  gramas /dia ou 3+) ou cilindrúria anormal.
8. **Alterações neurológicas:** convulsão ou psicose (ambas, na ausência de outra causa).
9. **Alterações hematológicas:** anemia hemolítica ou leucopenia (menor que  $4.000/mm^2$  em duas ou mais ocasiões) ou linfopenia (menor que  $1.500 /mm^2$  em duas ou mais ocasiões) ou plaquetopenia (menor que  $100.000/mm^2$  na ausência de outra causa).
10. **Alterações imunológicas:** anticorpo anti-DNA nativo ou anti-Sm ou presença de anticorpo antifosfolípide com base em: níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina; teste positivo para anticoagulante lúpico ou teste falso positivo para sífilis por no mínimo seis meses.
11. **Anticorpos antinucleares:** título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência indireta ou método equivalente, em qualquer época, e na presença de drogas conhecidas por estarem associadas à síndrome de lúpus induzido por drogas.





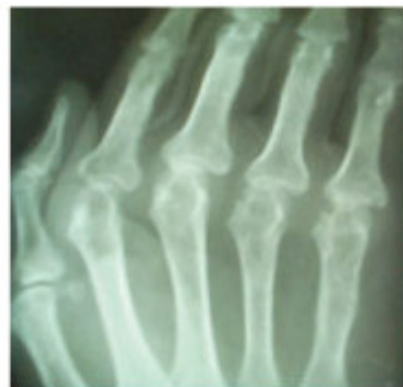
**Figura 1- Eritema Malar  
(GILMORE, 2010)**



**Figura 2 - Eritema malar descamativo difuso  
(BUGNI et al., 2008)**



**Figura 3 - Lesão discóide  
(GILMORE, 2010)**



**Figura 4 - Mão e raios-X com artropatia erosiva (CAZNOCH et al., 2006)**

Ressalta-se que, segundo o Consenso de Lúpus Eritematoso Sistêmico brasileiro, embora infrequente, é possível haver portadores de LES que não apresentem quatro dos critérios, especialmente quando possuem anticorpos específicos para o LES (anti-DNA nativo em títulos moderados ou altos ou anti-Sm) e apenas uma manifestação clínica (BORBA et al., 2008).

Dados epidemiológicos revelam que o LES tem distribuição mundial e ocorre em todas as etnias (BORBA et al., 2008), havendo uma incidência maior em negros (1:250) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

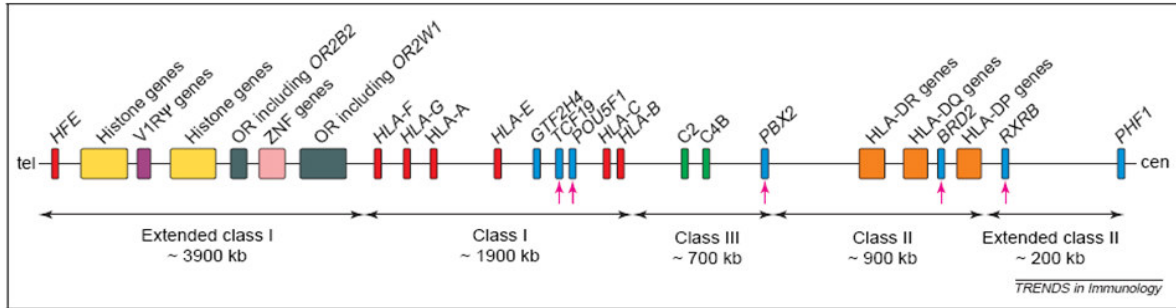
O LES é uma doença rara, que afeta principalmente mulheres jovens, na fase reprodutiva, numa proporção feminino:masculino de 9 a 10:1 (BORBA et al., 2008).

Estudos de prevalência, ao redor do mundo, estimam uma variação entre 12 a 124 casos por 100.000 habitantes (GABRIEL; MICHAUD, 2009). No Brasil, não há estudos epidemiológicos sobre a prevalência do LES, mas calcula-se que existam entre 16.000 a 80.000 casos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2010).

No que refere à incidência, na cidade de Natal, localizada no estado do Rio Grande do Norte, no nordeste brasileiro, foi identificada a maior incidência mundial de LES: 8,7 casos novos/100 mil habitantes/ano (VILAR; SATO, 2002), sendo que estudos em norte-americanos apontam uma variação de 1,5 a 7,6 por 100 mil habitantes/ano (GABRIEL; MICHAUD, 2009; VILAR; SATO, 2002).

De etiologia ignorada, o LES é, provavelmente, resultante de uma complexa interação de fatores hormonais, ambientais e genéticos (SHANKARKUMAR et al., 2003; McHUGH et al., 2006; BORBA et al., 2008).

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) tem sido o fator de risco genético mais consistentemente associado ao lúpus (FERNANDO et al., 2007). É constituído por um conjunto de genes codominantes, altamente polimórficos, situado no braço curto do cromossomo seis e que codifica moléculas que, na espécie humana, foram identificadas a primeira na superfície de leucócitos; daí a designação de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) (KLEIN; SATO, 2000; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008) (Figura 5).



**Figura 5 – Organização genômica do Complexo HLA Estendido (ZIEGLER; KENTENICH; UCHANSKA-ZIEGLER, 2005)**

O Complexo HLA clássico possui cerca de 200 genes, 3600 quilobases (Kb) e, compõe-se, entre outros, de duas regiões principais envolvidos na resposta imune: a região telomérica HLA-Classe I, que compreende os genes HLA-A, B e C e a região centromérica HLA-Classe II, que inclui os genes HLA-DP, DQ e DR (KLEIN; SATO, 2000; GRAHAM et al., 2007). O HLA estendido, definido recentemente, possui 421 genes, 7600 Kb e cinco regiões: classes I, II, III clássicas e classes I e II estendidas (FERNANDO et al., 2007).

Os genes HLA estão em locos muito próximos e por isso são herdados em conjunto no mesmo cromossomo, constituindo uma unidade denominada haplótipo (ALVES et al., 2005)

A molécula HLA Classe II DR em sua conformação inicial compõe-se da cadeia  $\alpha$  (que possui dois domínios -  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ ) e da cadeia  $\beta$  (também formada por dois domínios  $\beta 1$  e  $\beta 2$ ) (Figura 6). A família gênica HLA-DR abrange: um único gene DRA, que codifica a cadeia  $\alpha$ ; nove genes DRB, dos quais quatro (DRB1, DRB3, DRB4 e DRB5) codificam a cadeia  $\beta$  e cinco pseudogenes (DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 e DRB9). Pelo fato de a cadeia  $\alpha$  ser codificada por um único gene - que possui apenas três alelos - praticamente todo o polimorfismo encontra-se na cadeia  $\beta$  - domínio  $\beta 1$ ), sendo a identificação dos genes DR efetuada com base nesses alelos DRB funcionais (DONADI, 2000; NATIONAL..., 2010; THE INTERNATIONAL..., 2010).

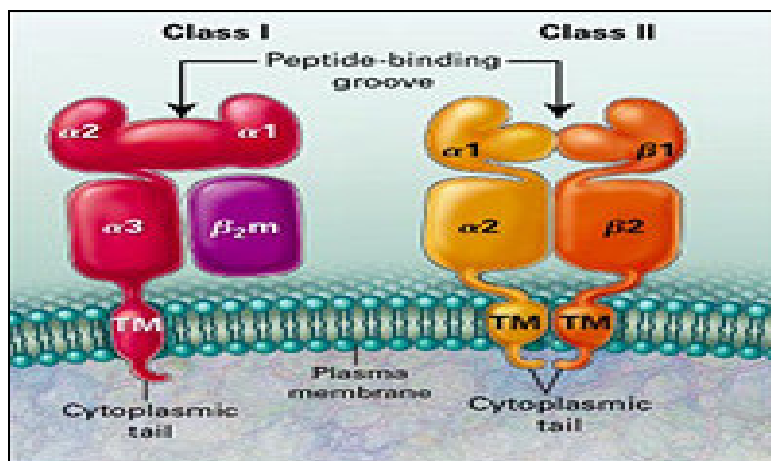


Figura 6 - Estrutura das moléculas HLA Classe I e Classe II ( KLEIN; SATO, 2000)

A complexidade é ainda mais ampla, pois em cada um dos locos DRB funcionais, há variantes alélicas, assim distribuídas: DRB1: 785, DRB3: 52, DRB4: 14 e DRB5: 19. É um caso clássico de polimorfismo genético (THE INTERNATIONAL..., 2010).

A cadeia  $\beta$  é codificada por seis exons: o exon 1 codifica o peptídeo líder, os exons 2 e 3 codificam os dois domínios extracelulares, o exon 4 codifica a região transmembrana e o exon 5 codifica o domínio citoplasmático (NATIONAL..., 2010).

A função das moléculas HLA é ligar-se a fragmentos de antígenos proteicos, para apresentá-los aos receptores dos linfócitos T. Estes são antígenos-específicos e não reconhecem antígenos na forma livre ou solúvel; ao contrário, só reconhecem tais fragmentos peptídicos se estes estiverem complexados em uma fenda física ou sulco extracelular da molécula HLA, denominada 'fenda de ligação de peptídeo'. De fato, a molécula HLA em sua conformação completa é um heterodímero composto por três estruturas: a cadeia  $\alpha$ , a cadeia  $\beta$  e o peptídeo antigênico a ela ligado, constituindo um complexo CPH-peptídeo estável, apto a ser expresso na superfície celular (DONADI, 2000; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

A designação dos alelos de Classe II consiste de três letras: D indica a classe II; a segunda (P, Q e R) indica a família e a terceira (A ou B) indicam a cadeia  $\alpha$  ou  $\beta$ , respectivamente. Os genes individuais do sistema HLA são identificados por números arábicos após a identificação da cadeia e a nomenclatura das numerosas variantes alélicas desses genes é um número precedido por um asterisco. Por exemplo: HLA-DRB1\*1501 – alelo específico 1501, do gene 1, codificado pela cadeia  $\beta$ , da família R, da classe II (KLEIN; SATO, 2000; ALVES, 2006).

A nomenclatura do sistema HLA é revista e atualizada periodicamente por um comitê internacional (World Health Organization Nomenclature Committee for Factors of the HLA System), que é responsável pela denominação e controle de qualidade de novos genes e sequências alélicas. A atualização mais recente passou a vigorar em abril de 2010 e definiu, entre outras mudanças, a inclusão de dois pontos (:) entre o grupo alélico e as especificidades alélicas subsequentes. Por exemplo: HLA-DRB1\*01:01:01 (HLA...,2010).

Os genes do sistema HLA controlam as respostas imunológicas a todos os antígenos protéicos. Sua importância aplica-se à avaliação da compatibilidade entre doador e receptor de transplantes, além de ser ferramenta relevante no entendimento da patogenia de várias doenças. O conhecimento dos alelos ou haplótipos HLA herdados por um indivíduo permite prever o risco de ele vir a desenvolver determinada doença ou estar protegido dela (ALVES et al., 2006).

Embora associações de genes HLA com doenças autoimunes sejam estudadas desde a década de 1970, os mecanismos implicados nessas associações permanecem obscuros. São propostas hipóteses para explicá-los (DONADI et al., 2000; ALVES et al., 2005):

- a) Moléculas HLA podem funcionar como receptores para alguns agentes etiológicos, facilitando ou impedindo a entrada de vírus nas células.
- b) Mimetismo molecular entre os antígenos HLA e antígenos de microorganismos. Certos sítios HLA assemelham-se a sequências de antígenos exógenos e ao se ligarem a estes desencadeiam uma resposta imune de ataque. Se esse antígeno exógeno exibir similaridade estrutural com proteínas próprias, a resposta imune pode ser direcionada ao próprio hospedeiro.
- c) Indução aberrante de moléculas HLA de Classe II: células teciduais que normalmente não expressam moléculas HLA de Classe II podem apresentar aos linfócitos T antígenos derivados da degradação do próprio tecido.

Estudos com genes HLA têm recebido particular atenção em LES humano, pois evidências sustentam a função desses genes como fatores de risco para expressão da doença em muitas populações (VARGAS-ALARCÓN et al., 2001; LEE et al., 2003).

A literatura concernente às associações do HLA com LES frequentemente apresenta-se divergente, com discrepâncias na distribuição de alelos entre diferentes grupos étnicos (SMERDEL-RAMOYA et al., 2005).

Assim, devido às diferenças interétnicas nas frequências dos alelos (RUDWALEIT et al., 1995), que possibilitam uma variedade de associações entre LES e

HLA em grupos populacionais distintos, o estudo de alelos e haplótipos para cada população faz-se necessário (CORTES et al., 2004), pois pode contribuir para identificar mais precisamente quais genes estão envolvidos na susceptibilidade da doença (RUDWALEIT et al., 1995).

A identificação de genes HLA associados a doenças em populações altamente miscigenadas, como a brasileira, pode representar dificuldades em virtude do polimorfismo mais acentuado, todavia é essencial, pois permite a descoberta de novas associações, assim como a ratificação das já existentes (DONADI, 2000).

O objetivo principal deste estudo é analisar a associação do LES com o gene HLA-DRB1\* em uma amostra da população maranhense. As características do LES - doença complexa; multissistêmica; multifatorial; associada a múltiplos genes polimórficos; que acomete todas as faixas etárias e grupos étnicos distintos, em nações diversas; que evolui de forma imprevisível e cuja etiologia e cura são ignoradas – justificam a escolha. Busca-se contribuir com a literatura, na identificação de aspectos genéticos do LES - o que, por sua vez, é importante para medidas futuras de prevenção, diagnóstico e tratamento (BORBA et al., 2008; ALVES et al., 2006).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA – ASPECTOS GENÉTICOS

Os genes HLA têm sido objeto de estudo nas doenças infecciosas como hanseníase (VISENTAINER et al., 1997) e Hepatite C (CORGHI et al., 2008) e nas doenças autoimunes, como: artrite reumatoide, esclerose múltipla, febre reumática, (ALVES et al., 2006; FERNANDO et al., 2008) Diabetes tipo I (ALVES et al., 2006) e LES.

Estudos em diferentes grupos populacionais têm identificado alelos HLA de susceptibilidade e de proteção para o LES. As mais fortes associações positivas são com genes HLA Classe II HLA-DR2 (HLA-DRB1\*1501) e HLA-DR3 (HLA-DRB1\*0301) e seus respectivos haplótipos em caucasianos (CHRISTIAN et al., 2007; FERNANDO et al., 2007).

Em uma amostra de negros da África do Sul, o alelo HLA-DRB1\*02 foi mais frequente em pacientes com LES comparados com controles [(34,7% vs 12,6%) OR=3,67 IC95%(1,49-9,20) p<0,0001]; havendo, portanto, evidências de que esse alelo contribui para a susceptibilidade à doença nessa população (RUDWALEIT et al., 1995).

Em estudo com três grupos étnicos distintos (caucasianos, afro-americanos e hispânicos), foram observados três fatores de risco para o LES, também distintos: um para cada grupo analisado. O alelo HLA-DRB1\*1501, no grupo de pacientes afro-americanos quando comparado com controles desse mesmo grupo étnico [(38% vs 22%) p=0,046]. O alelo HLA-DRB1\*08 em hispânicos com LES em comparação a controles etnicamente similares [(40% vs 16%) p=0,008]. O alelo HLA-DRB1\*0301 nos caucasianos, comparados com controles da mesma etnia [(51% vs 25%) p=0,0003]. Uma frequência maior deste alelo também foi encontrada nos hispânicos com LES (20% vs 9%), sem, contudo, apresentar significância estatística (REVEILLE et al., 1998).

Em uma amostra da Islândia, cuja composição étnica é de caucasianos, o alelo HLA-DRB1\*03 foi mais frequente entre os pacientes com LES que entre os controles, porém não foi estatisticamente significativo [(23,4% vs 15,7%) p=0,3] (STEISSON et al., 1998).

Estudo em mexicanos mestiços identificou uma frequência maior do alelo HLA-DRB1\*0301 em pacientes com LES comparados com grupo controle, configurando esse alelo como um fator de risco para o LES nessa amostra [(11,1% vs 4,5%) OR=2,63 IC95%(1,08-6,53) p=0,031]. Em contraste, foram identificados dois alelos com frequência menor entre os pacientes: HLA-DRB1\*0802 e HLA-DRB1\*1101 [(7,4% vs 15%) OR=0,45 IC95%(0,21-0,95) p=0,035] e [(1,2% vs 6,0%) OR=0,19 IC95%(1,2-6,0) p=0,037], respectivamente, sugerindo um possível efeito protetor desses alelos na susceptibilidade para o LES (VARGAS-ALARCÓN et al., 2001).

Entre tailandeses, o alelo HLA-DRB1\*1502 apresentou frequência maior nos pacientes com LES em comparação com os controles, caracterizando-se como um alelo de susceptibilidade à doença [(24,1% vs 12,3%) OR=2,27 IC95%(1,43-3,59) p=0,009]. Os alelos DRB1\*1501 e DRB1\*1602, da mesma forma, evidenciaram frequência superior entre os pacientes, porém, não houve significância estatística: [(12,9% vs 6,7%) OR=2,08 IC95%(1,15-3,78)] e [(9,4% vs 4,3%) OR=2,32 IC95%(1,15-4,67)], respectivamente. Por outro lado, os alelos DRB1\*1202, DRB1\*1401 e DRB1\*0406 foram menos frequentes no grupo com LES, que nos controles, também sem significância: [(9,4% vs 18,7% OR=0,45 IC95%(0,26-0,79)], [(0 vs 3,5% OR=0,00 IC95%(0,00-0,85)] e [(0% vs 4,3% OR=0,00 IC95%(0,00-0,68)]. Quanto aos haplótipos, o DRB1\*1502-DQB1\*0501 foi mais frequente entre pacientes com LES, comparados com os controles [(19,4% vs 7,8%) OR=2,87 IC95%(1,70-4,83) p=0,002]. Nesse estudo, o alelo DRB1\*1502 foi fator de risco para o LES, na análise alélica e na análise haplotípica (SIRIKONG et al., 2001).

Trabalho realizado com caucasianos italianos identificou uma frequência maior do alelo HLA-DRB1\*0301 no grupo com LES que no grupo controle, configurando-o como um fator de risco para o LES na amostra [(35,6% vs 19,4%) OR=2,31 IC95%(1,53-3,49) p<0,01]. Os alelos DRB1\*0701 e DRB1\*1501 foram mais frequentes no grupo de pacientes em comparação com os controles, porém, sem significância estatística: [(28,3% vs 23,6%) OR=1,28 IC95%(0,85-1,92)] e [(14,7% vs 10,8%) OR=1,47 IC95%(0,85-2,54)], respectivamente. Ressalta-se, ainda, o efeito nefritogênico do alelo DRB1\*1501, isto é, sua associação com o aumento do risco de desenvolver nefrite lúpica, comparando-se pacientes com nefrite e controles saudáveis [(21,1% vs 10,8% OR=2,27 IC95%(1,08-4,72) p=0,028] (MARCHINI et al., 2002).

Estudo caso-controle em coreanos encontrou um fator de risco e dois fatores de proteção para o LES. O alelo DRB1\*15 foi mais frequente no grupo com LES que no grupo controle [(17,4% vs 11,1%) OR=1,7 IC95%(1,1-2,6) p=0,015]. Em contraste, os alelos DRB1\*01 e DRB1\*04 apresentaram frequência menor entre os pacientes com LES [(4,3% vs 10,1%) OR=0,4 IC95%(0,2-0,7) p<0,001] e [(12,9% vs 21,2%) OR=0,6 IC95%(0,4-0,8) p<0,001] (LEE et al., 2003).

Nesse estudo foram identificados também alelos HLA-DRB1\* associados a subfenótipos clínicos e laboratoriais do LES. O alelo DRB1\*07 foi fator de risco para a nefrite lúpica, comparando-se com controles saudáveis. Verificou-se, ainda, uma frequência significativamente maior de: nível sérico de creatinina em portadores do DRB1\*01; de anticorpo Anti-RNP em pacientes com DRB1\*11 e DRB1\*15; de anticorpo Anti-La em



pacientes com DRB1\*07 ou DRB1\*08; de lúpus anticoagulante em pacientes com DRB1\*12 e anemia hemolítica em pacientes com DRB1\*07. Em pacientes com artrite foi observada frequência maior do alelo DRB1\*04 e em pacientes com Fenômeno de Raynaud, de DRB1\*09, porém, sem significância estatística (LEE et al., 2003).

Estudo na Hungria identificou alelos com frequência maior e alelos com frequência menor no grupo de pacientes, em comparação com os controles, não havendo significância estatística em ambos os resultados: DRB1\*1501, DRB1\*03 e DRB1\*07 [(24% vs 6%) OR= 4,4], [(40% vs 20%) OR=2,25] e [(34% vs 2%) OR= 3,2], respectivamente e DRB1\*04 e DRB1\*11/12 [(6% vs 32%) OR=2,87] e [(30% vs 50%) OR=6,05]. O alelo DRB1\*1101 ocorreu somente no grupo de pacientes com LES (25% vs 0%) (ENDREFFY et al., 2003).

Em estudo caso-controle desenvolvido no Oeste da Índia, o alelo DRB1\*0301 foi mais frequente em pacientes gravemente afetados por LES comparados com controles saudáveis [(50% vs 3,7%) OR=9,67 IC95% (8,41-13,56) p<0,0001]. Em contraste, os alelos DRB1\*14(6) e DRB1\*1001 foram menos frequentes no grupo de pacientes que no grupo controle [(12,5% vs 40,0%) OR=0,25 IC95%(1,09-2,56) p<0,001] e [(6,3% vs 30,0%) OR=0,21 IC95%(1,84-2,35) p<0,001] (SHANKARKUMAR et al., 2003).

Calvo-Alén et al. (2003) estudaram dois subgrupos de pacientes espanhóis com lúpus, ambos residentes no estado americano do Texas, com ancestrais étnicos distintos: espanhóis do norte da Espanha e espanhóis, originalmente de ancestrais mexicanos, referidos com espanhóis e hispano-americanos, respectivamente. O alelo DRB1\*08 foi encontrado em maior frequência no grupo de hispano-americanos, comparado com controles da mesma etnia, caracterizando-se como um fator de risco para o LES nesse grupo [(35% vs 16%) p<0,01]. Os alelos DRB1\*0301 e DRB1\*1501 foram mais frequentes nos dois subgrupos de pacientes, todavia, à comparação com o grupo controle correspondente, só o DRB1\*0301 revelou significância estatística [(21% vs 9%) p< 0,05].

Estudo com pacientes do oeste mexicano identificou alelos e haplótipos Classe II fatores de risco e fatores de proteção para o LES. Os fatores de risco individuais foram HLA-DQA1\*0102 e HLA-DQB1\*0402 e no loco DRB1 o HLA-DRB1\*15 [(12,2% vs 3,7%) OR=4,02 IC95%(1,2-15,1) p=0,023]. O haplótipo HLA-DQB1\*0602-DQA1\*0102-DRB1\*15 foi mais frequente entre os pacientes, podendo ser considerado um haplótipo de susceptibilidade [(10,4% vs 0,9%) OR=13,95 IC95%(1,7-303,5) p=0,002]. Assim, nesse estudo, o alelo DRB1\*15 foi fator de risco para o LES tanto na análise alélica quanto na haplotípica. Já o haplótipo HLA-DQB1\*0303-\*0301-HLA-DRB1\*04 apresentou frequência

menor no grupo com LES, comparados com os controles, porém, sem significância estatística [0% vs 4,3%)  $p=0,12$ ] (CORTES et al., 2004).

Em um grupo de pacientes com LES da Tunísia, foram encontradas frequências mais elevadas de DRB1\*0301 e DRB1\*1501, enquanto as frequências dos alelos DRB1\*0801 e DQB1\*03 foram menores no grupo de pacientes em comparação com os controles. Porém, nenhum desses resultados evidenciou significância estatística (AYED et al., 2004).

Pesquisa em pacientes com LES e controles noruegueses evidenciou fatores de risco e fatores de proteção para o LES. Os fatores de risco incluíram alelos Classe I (A\*01 e B\*08) e um alelo classe II: DRB1\*0301 [(25% vs 11%) OR=2,7 IC95%(1,8-3,9)  $p<0,01$ ]. O fator de proteção detectado foi o alelo HLA-DRB1\*04 [(12% vs 22%) OR=0,5 IC95%(0,3-0,7)  $p=0,015$ ]. Ainda nesse estudo, o alelo DRB1\*1501 apresentou frequência maior no grupo com LES que no grupo controle, mas não foi estatisticamente significativa [(22% vs 17%) OR=1,4 IC95%(1,0-2,1)] (SMERDEL-RAMOYA et al., 2005).

Em estudo desenvolvido na Inglaterra com 157 pacientes (151 caucasianos, quatro afro-caribenhos e dois descendentes de chineses), o alelo DRB1\*0301 foi mais frequente no grupo com LES, comparando-se com os controles, sendo um fator de risco para o LES na amostra analisada [(40% vs 21%) OR=2,5 IC95%(1,6-3,8)  $p<0,001$ ]. O alelo DRB1\*07 apresentou frequência menor no grupo de pacientes que no grupo controle, mas não houve significância estatística [(16% vs 25%) OR=0,6 IC95%(0,3-0,9)] (McHUGH et al., 2006).

Em jamaicanos, a frequência de HLA-DR4 (DRB1\*04) foi menor em pacientes com LES que em controles saudáveis, configurando esse alelo como fator de proteção ao LES nessa população [(2% vs 20%) OR=0,12  $p=0,005$ ]. Nesse estudo não foram constatados alelos de susceptibilidade para o lúpus (CHRISTIAN et al., 2007).

Estudo no Reino Unido identificou um fator de risco para o LES: o alelo HLA-DRB1\*0301 [(27,7% vs 12,7%) OR=2,3 IC95%(1,7-3,2)  $p=49 \times 10^{-7}$ ]. Diferentemente do esperado pelos autores, os alelos HLA-DRB1\*1501 e DRB1\*0801 não apresentaram evidência de associação significativa com a susceptibilidade para a doença, conforme as frequências de casos e controles observadas: (14,4% vs 14,7%) e (2,2% vs 2,0%), respectivamente (FERNANDO et al., 2007).

O alelo HLA-DRB1\*1501 foi mais frequente em pacientes brasileiros com LES de início precoce, com comprometimento renal, musculoesquelético, cutâneo, hematológico, cardíaco, bem como exames positivos para autoanticorpos anti-dsDNA, anti-Sm, Anti-UI-RNP e Anti-SSA/Ro. As frequências dos alelos DRB1\*17 ( $p=0,034$ ), DRB1\*10 ( $p=0,03$ ),

DRB1\*15 ( $p=0,011$ ) e DRB1\*07 ( $p=0,012$ ) foram significativamente maiores em pacientes com nefrite lúpica (LIPHAUS; KISS; GOLDBERG, 2007).

Estudo em caucasianos norte-americanos evidenciou, também, a ocorrência de haplótipos de susceptibilidade para o LES: DRB1\*1501/DQB1\*0602 e DRB1\*0301/DQB1\*0201 (GRAHAM et al., 2007).

Trabalho recente em uma amostra populacional de Taiwan confirmou dois alelos como marcadores de susceptibilidade para o LES na amostra analisada: HLA-DRB1\*0301 e HLA-DRB1\*1501, cujas frequências foram maiores no grupo de pacientes que no grupo controle [(13,8% vs 7,4%) OR=2,01 IC95%(1,7-3,2)  $p=0,02$ ] e [(15,2% vs 8,0%) OR=2,06 IC95%(1,36-3,13)  $p=0,01$ ], respectivamente. Detectou, ainda, um alelo fator de proteção para a nefrite lúpica: HLA-DRB1\*1202 [(6,7% vs 23,9%) OR=0,23 IC95%(0,09-0,57)  $p<0,01$ ] (PAN et al., 2009).

Estudo em crianças egípcias com LES encontrou uma frequência maior do alelo HLA-DRB1\*15 nesse grupo, comparado com os controles [OR = 4,76 IC95%(1,83-12,4)  $p = 0,012$ ] (MOSAAD et al., 2010).

### **3. OBJETIVOS**

#### **Geral**

Analisar a associação do gene HLA-DRB1\* com Lúpus Eritematoso Sistêmico.

#### **Específicos**

- Identificar características demográficas da amostra em estudo.
- Verificar a frequência dos alelos HLA-DRB1\* em pacientes com diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico.
- Identificar associações dos alelos HLA-DRB1\* com Lúpus Eritematoso Sistêmico.

#### 4. CAPÍTULO 1

Artigo Formatado conforme instruções da Revista Brazilian Journal of Medical and Biological Research - The Official Journal of the Associação Brasileira de Divulgação Científica (ABDC). Impact Factor: 1.215.

#### **ASSOCIAÇÃO ALÉLICA DO GENE HLA-DRB1\* COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO DO NORDESTE DO BRASIL.**

Geísa Beltrão dos Reis Viana <sup>1\*</sup>, Fernando José Brito Patrício <sup>1</sup>, Bruno de Almeida Nunes <sup>1</sup>, Fábio França Silva <sup>1</sup>, Alcione Miranda dos Santos <sup>2</sup>, José Mauro Fernandes Carneiro <sup>3</sup>, Emygdia Rosa do Rego Barros Pires Leal Mesquita <sup>1</sup>.

Laboratório de Estudos Genômicos e Histocompatibilidade, Hospital Universitário<sup>1</sup>. Departamento de Saúde Pública<sup>1</sup>. Serviço de Reumatologia do Hospital Universitário<sup>3</sup>. Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, 65.085-580, Maranhão - Brasil.

Running Title: **ALELOS HLA-DRB1\* E LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.**

---

*\*Corresponding author: Universidade Federal do Maranhão, Hospital Universitário – Unidade Materno-Infantil, Laboratório de Estudos Genômicos e Histocompatibilidade, Rua Silva Jardim nº215 – Centro, São Luís – MA– Brazil CEP: 65020-560. Tel.: (98) 2109-1258. E-mail address: geisabeltrao@uol.com.br (Geísa Beltrão dos Reis Viana).*

## ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune, multisystem, clinically heterogeneous disease, which etiology is unknown and involves an interaction of genetic, hormonal and environmental factors. Polymorphisms of Major Histocompatibility Complex have been associated with susceptibility to SLE in different populations around the world. The aim of the present study was to investigate the association of HLA-DRB1\* gene with lupus. We studied 80 patients and 80 controls, matched for sex, from Maranhão State, Brazil. A specific questionnaire and review of medical records were used to obtain demographic data. Genotyping of HLA-DRB1\* was performed by polymerase chain reaction with sequence-specific oligonucleotide probes. Patient demographic characteristics were: 90% were woman; 21,60% answered to have a member of family with SLE and 23% classified themselves as black; mean age was 29,91±8,64 years and mean age at diagnosis was 25,06±8,50 years. HLA-DRB1\*15 allele frequency was higher among SLE patients than among controls [(18.12% versus 6.25%) OR=3.98 CI95%(1.68–9.93) p=0.0005]. Two alleles were over-represented in patients group compared to the controls, but the difference did not reach statistical significance: HLA-DRB1\*03 [(11.25% versus 6.88%) OR=1.82 CI95%(0.74–4.60) p=0.1508] and HLA-DRB1\*08 [(11.88% versus 5.62%) OR=2.45 CI95%(0.96–6.61) p=0.0375]. The frequency of the alleles HLA-DRB1\*01 [(3.75% versus 15.00%) OR=0.18 CI95%(0.59–0.52) p=0.0003] and HLA-DRB1\*04 [(8.12% versus 15.62%) OR=0.42 CI95%(0.18–0.96) p=0.0258] were both lower among patients compared to controls. The findings were consistent with previous data in other populations. They suggest that the HLA-DRB1\*15 allele is a risk factor for SLE, while the HLA-DRB1\*01 e HLA-DRB1\*04 alleles are protective.

**Keywords:** Systemic Lupus Erythematosus. HLA-DRB1\* gene. Association study.

## INTRODUÇÃO

Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença crônica, autoimune, multissistêmica, remitente e recidivante, caracterizada por manifestações clínicas diversificadas, que incluem alopecia, artralgia, fadiga e eritema, além de complicações renais, neurológicas ou cardiopulmonares (1,2).

Embora seja uma doença rara, tem distribuição mundial e ocorre em todas as etnias, havendo uma incidência maior em negros (1:250). Predomina em mulheres na fase reprodutiva, numa proporção feminino: masculino de 9-10:1. A prevalência é estimada em 12 a 124 casos por 100.000 habitantes. No Brasil, onde não há estudos de prevalência, calculam-se entre 16.000 a 80.000 casos, sendo que a cidade de Natal, no nordeste brasileiro, registra a maior incidência mundial de LES: 8,7 casos/100 mil habitantes/ano (1, 3-6).

De etiologia ignorada, o LES é, provavelmente, resultante da interação de fatores hormonais, ambientais e genéticos. O complexo Antígeno Leucocitário Humano (HLA) tem sido o fator de risco genético mais consistentemente associado ao lúpus. O HLA clássico é constituído por cerca de 200 genes codominantes, altamente polimórficos, situados no braço curto do cromossomo 6. Possui 3600 quilobases (Kb) e compõe-se de duas regiões principais: a região telomérica HLA-Classe I, que compreende os genes HLA-A, B e C e a região centromérica HLA-Classe II, que inclui os genes HLA-DP, DQ e DR. O HLA estendido, definido recentemente, possui 421 genes, 7600 Kb e cinco regiões: classes I, II, III clássicas e classes I e II estendidas (1, 2, 7, 8).

Os genes HLA controlam as respostas imunológicas aos antígenos protéicos. As moléculas HLA ligam-se a fragmentos desses antígenos e apresenta-os aos receptores de linfócitos T, que só os reconhece se complexados na fenda da molécula HLA, constituindo um heterodímero com três estruturas: as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da molécula e o peptídeo antigênico (9).

A importância do sistema HLA aplica-se à avaliação da compatibilidade entre doador e receptor de transplantes, além de contribuir para entendimento da patogenia de várias doenças. A identificação dos genes HLA de um indivíduo permite prever o risco de ele vir a desenvolver determinada doença ou estar protegido dela. Os genes HLA vêm sendo objeto de estudo em doenças infecciosas, como hanseníase e Hepatite C e em doenças autoimunes: artrite reumatoide, esclerose múltipla, Diabetes tipo I e LES (2,9-13).

Estudos em diferentes populações apontam alelos HLA-DRB1\* associados à susceptibilidade ou à resistência ao LES. Os fatores de risco incluem: HLA-DRB1\*02 em negros da África do Sul; HLA-DRB1\*08 em hispano-americanos e hispânicos; HLA-DRB1\*0301 em caucasianos, mexicanos mestiços, caucasianos italianos, hispano-americanos, noruegueses, indianos, taiuaneses e britânicos. Também, o alelo HLA-DRB1\*15 foi fator de risco para o LES em coreanos, mexicanos e egípcios e suas variantes: DRB1\*1501, em afro-americanos e taiuaneses e DRB1\*1502 em tailandeses. Há, ainda, haplótipos de risco, que são: HLA-DQB1\*0602-DQA1\*0102-DRB1\*15 e HLA-DRB1\*1502-DQB1\*0501 (7, 14-25).

Há alelos cujas frequências são maiores entre pacientes com LES que nos controles, porém, sem significância estatística: HLA-DRB1\*1602 em tailandeses; HLA-DRB1\*03 em húngaros e islandeses e DRB1\*0301 em espanhóis do norte e tunisianos; HLA-DRB1\*0701 em italianos e húngaros; HLA-DRB1\*1501 em espanhóis do norte e hispano-americanos, italianos, noruegueses, tailandeses, húngaros e tunisianos (15, 18, 19, 25-28).

Em contraste, estudos assinalam alelos fatores de proteção para o LES: HLA-DRB1\*0802 e HLA-DRB1\*1101 em mestiços mexicanos; HLA-DRB1\*04 em noruegueses e coreanos e HLA-DRB1\*01 em coreanos; HLA-DRB1\*14/6 e HLA-DRB1\*1001 em indianos. Há, também, relatos de alelos menos frequentes em pacientes com LES, contudo, sem significância estatística: HLA-DRB1\*1202 e DRB1\*1401 em tailandeses; DRB1\*11/12 em húngaros; HLA-DRB1\*0801 em tunisianos; HLA-DRB1\*04 em húngaros e jamaicanos;



a variante HLA-DRB1\*0406 em tailandeses e o haplótipo HLA-DQB1\*0303-\*0301-DRB1\*04 em mexicanos (17, 19, 20, 22, 23, 25, 26, 28 e 29).

A literatura concernente às associações do HLA com LES apresenta discrepâncias na distribuição de alelos entre diferentes grupos étnicos (19). Por isso, o estudo de genes HLA em cada população é necessário (17,23), o que permite identificar precisamente quais genes estão envolvidos na susceptibilidade à doença (14). Em populações miscigenadas, como a brasileira (trihíbrida, com ancestrais europeus, africanos e ameríndios), a identificação dessas associações pode ser mais difícil, devido ao polimorfismo mais acentuado, todavia é essencial, pois permite descrever novos fatores de risco ou de proteção, ou confirmar os já existentes (9, 30).

O objetivo principal deste estudo foi analisar a associação do LES com o gene HLA-DRB1\* em uma amostra de maranhenses, contribuindo para a identificação de aspectos genéticos do LES, o que é importante para medidas futuras de diagnóstico, prevenção e tratamento (10).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostra em estudo**

Foi realizado um estudo caso-controle, com uma amostra de conveniência, na Unidade Presidente Dutra do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA), hospital terciário integrante do Sistema Único de Saúde, localizado na cidade de São Luís, estado do Maranhão, região Nordeste do Brasil.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (CEP-HUUFMA), sob Protocolo N°004321/08. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A amostra incluiu 80 pacientes com LES atendidos na referida Unidade, no ano de 2009, em nível ambulatorial (Serviço de Reumatologia e Unidade Renal) ou hospitalar (Serviço de Clínica Médica), denominado grupo LES. Os critérios de inclusão foram: ter nascido no estado do Maranhão, não ter parentesco com participantes da pesquisa e apresentar diagnóstico de LES, segundo critérios de classificação, estabelecidos pelo American College of Rheumatology (1,31).

O grupo controle continha 80 voluntários, cujos critérios de inclusão foram: não possuir vínculo de parentesco com integrantes da amostra, ter nascido no Maranhão, não ter relato de doenças autoimunes e história familiar de LES. Incluiu funcionários e acompanhantes recrutados no referido hospital, de forma não sistemática. Os dois grupos foram pareados por sexo.

### **Dados demográficos**

Foram coletados por meio de preenchimento de formulário específico e de revisão de prontuário hospitalar.

### **Análise Molecular**

Foi efetuada no Laboratório de Estudos Genômicos e Histocompatibilidade (LEGH) do HUUFMA. Amostras de DNA foram isoladas de sangue periférico, com o kit comercial EZ-DNA<sup>®</sup> (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), usando protocolos de extração padronizados pelo fabricante.

O gene HLA-DRB1\* foi tipificado pela metodologia PCR-SSO (Reação em Cadeia da Polimerase – Oligonucleotídeo Sequência Específica), utilizando uma mistura de *primers* HLA loco-específicos, que amplificam o exon 2 do gene DRB1\* - *primers* RSSO2B1 para HLA Classe II - loco DRB1 - Kit Lab Type<sup>™</sup> SSO (One Lambda<sup>®</sup> Inc., Canoga Park, CA, USA)

As amostras foram processadas em citômetro de fluxo Labscan<sup>™</sup> 100 e analisadas por meio do programa HLA Fusion<sup>™</sup> (One Lambda, Canoga Park, CA, USA, versão 1.2.1).

### **Análise Estatística**

As variáveis quantitativas foram apresentadas por meio de média e desvio padrão e as qualitativas por frequência e percentual.

Para comparar as frequências dos alelos em ambos os grupos, foi utilizado o Teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher, quando necessário. Para ambos os testes, o nível de significância adotado foi de 5%. Também foram calculados os *Odds Ratios* (OR) e seus respectivos intervalos de confiança de 95%. Dados foram processados nos programas Epi Info<sup>™</sup> versão 3.4.3 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Estados Unidos) e Stata 9.0 (Stata Corporation, College Station, Texas, USA) (32, 33).

As frequências alélicas encontradas foram testadas para o equilíbrio de Hardy-Wemberg, usando o programa ARLEQUIM 3.1.1. (ARLEQUIN ver 3.1.1., Zoological Institute, University of Berne, Suíça) (34).

## RESULTADOS

A tabela 1 apresenta os dados demográficos coletados. No grupo LES, a idade média foi  $29,9 \pm 8,64$ , enquanto no grupo controle, a idade média foi  $38,96 \pm 10,09$ . 90% dos pacientes eram do sexo feminino. Quanto à procedência, 58,75% do grupo LES eram do interior do Estado do Maranhão e 53,75% dos controles, da capital São Luís. Os grupos étnicos mestiços (cafuzo, mulato ou outros) foram referidos em maior frequência pelos pacientes (58,8%) e pelos controles (72,5%) ( $p=0,06$ ). O grupo étnico negro foi declarado em maior frequência pelo grupo LES (23,8% versus 10,0%  $p=0,02$ ). A idade média ao diagnóstico foi  $25,06 \pm 8,50$  anos e a frequência de familiares com LES, segundo relato: 21,6% (Tabela 2).

Na amostra analisada, a distribuição dos genótipos HLA-DRB1\* estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p=0,72$ : grupo controle e  $p=0,21$ : grupo LES).

Dos 785 alelos presentes no loco HLA-DRB1\* (36), 13 foram encontrados nas amostras de pacientes e de controles maranhenses (Tabela 3).

O alelo HLA-DRB1\*15 apresentou frequência maior no grupo LES, comparando-se com os controles; configurando-se como um marcador de susceptibilidade para o lúpus, na amostra analisada [(18,12% versus 6,25%)  $OR=3,98$   $IC_{95\%}(1,68 - 9,93)$   $p=0,0005$ ].

Os alelos HLA-DRB1\*03 e HLA-DRB1\*08 foram mais frequentes no grupo LES que no grupo controle; no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa: [(11,25% versus 6,88%)  $OR=1,82$   $IC_{95\%}(0,74-4,60)$   $p=0,1508$ ] e [(11,88% versus 5,62%)  $OR=2,45$   $IC_{95\%}(0,96-6,61)$   $p=0,0375$ ], respectivamente.

Neste estudo, observaram-se, também, dois alelos com frequência menor entre os pacientes com LES que no grupo controle, caracterizando-os como fatores de proteção à doença: HLA-DRB1\*01 [(3,75% versus 15,00%)  $OR=0,18$   $IC_{95\%}(0,59 - 0,52)$   $p=0,0003$ ] e HLA-DRB1\*04 [(8,12% versus 15,62%)  $OR=0,42$   $IC_{95\%}(0,18-0,96)$   $p=0,0258$ ].

## DISCUSSÃO

Foram avaliados 80 pacientes com LES com idade média de  $29,91 \pm 8,64$  anos. Já o grupo controle apresentou idade média de  $38,96 \pm 10,09$ . Achados semelhantes para o grupo LES estão registrados: 31,8 anos, no Brasil; 28,9 anos, em Taiwan e  $30,1 \pm 10,5$  anos, na Tailândia (6,21 e 25). Entretanto, há estudos divergentes, onde os pacientes com LES apresentam faixa etária de maior amplitude (Tabela 3) e idade média superior: 12-75 anos e  $45 \pm 25$  anos, na Noruega; 21-76 anos e 41 anos, na Hungria e 17-72 anos e 38 anos, na Jamaica (19, 26, 29).

A idade ao diagnóstico apresentou média equivalente a  $25,06 \pm 8,50$  anos. Relatos anteriores indicam idade média ao diagnóstico aproximada em pacientes com LES: 31,80 anos e  $27,60 \pm 9,90$  anos (6,19).

No que se refere ao sexo, observou-se uma frequência de 90% de pacientes do sexo feminino, confirmando achados prévios referentes ao predomínio de LES nesse grupo. Vilar e Sato (2002) identificaram 88,4%; Sirikong et al. (2002), 87,00% e Fernando et al. (2008), 91,72%. Há, porém, estudos com frequência ainda maior de mulheres: 96,3% (CHRISTIAN et al., 2007) e 96 e 98% (CALVO-ALÉN et al., 2003), ratificando o Consenso de LES brasileiro, que aponta uma proporção entre feminino:masculino de 9-10:1 (1).

O grupo étnico negro foi declarado em maior frequência pelos pacientes (23,8% versus 10,0%  $p=0,02$ ), o que confirma relatos anteriores, segundo os quais LES predomina nesse grupo (3). Ressalta-se, todavia, que de acordo com Parra et al., (2003), brasileiros constituem uma população trihíbrida com raízes européias, africanas e ameríndias, e em nível individual, a cor da pele, determinada pela avaliação física, é um critério pobre de ancestrais genômicos africanos. Portanto, embora comum em inquéritos epidemiológicos, considera-se questionável a identificação da etnia por meio da autodeclaração, por se tratar de uma avaliação subjetiva, passível da influência de valores culturais e preconceitos do declarante;

além da disparidade fenótipo/genótipo. Já há proposta da definição da etnia por meio, também, de marcadores genéticos de ancestralidade (13).

Dos pacientes, 21,6% referiram possuir um único familiar com LES, o que condiz com estudo prévio: acima de 10% dos pacientes com LES têm outro membro da família com a doença (35).

Os dados demográficos detectados confirmaram aspectos epidemiológicos do LES já descritos. Em destaque, o elevado percentual de relatos sobre familiares com LES na amostra de pacientes.

Os resultados deste estudo referentes ao alelo HLA-DRB1\*15 ratificam estudos anteriores: constatou-se uma frequência maior desse alelo no grupo LES, comparado com os controles; sendo, pois, um alelo de susceptibilidade à doença na amostra analisada. O alelo HLA-DRB1\*15 também foi fator de risco para o LES em coreanos e mexicanos. O mesmo ocorreu com suas variantes HLA-DRB1\*1501 em afro-americanos e taiuaneses e HLA-DRB1\*1502 em tailandeses. Em dois desses estudos, o HLA-DRB1\*15 mostrou-se fator de risco para o LES, também na análise haplotípica: HLA-DQB1\*0602-DQA1\*0102-HLA-DRB1\*15 e HLA-DRB1\*1502-DQB1\*0501 (16, 21-23, 25).

Em húngaros, noruegueses, tailandeses, tunisianos, espanhóis do norte e hispano-americanos o alelo HLA-DRB1\*1501 apresentou frequência maior no grupo de pacientes com LES que entre os controles, porém, não houve significância estatística. Em italianos com LES, esse alelo apresentou frequência marginalmente mais alta. E em britânicos não revelou associação com o LES. Nenhum autor consultado descreveu esse alelo como fator de proteção ao lúpus (7, 15, 18, 19, 25, 26, 28).

Com relação aos subfenótipos do LES, o alelo HLA-DRB1\*1501 apresentou efeito nefritogênico em italianos e brasileiros. Esse alelo foi mais frequente em brasileiros com lúpus de início precoce, com comprometimento renal, musculoesquelético, cutâneo,

hematológico, cardíaco, bem como exames positivos para autoanticorpos específicos para o LES anti-dsDNA e anti-Sm. Em afro-americanos, especificidades do alelo HLA-DRB1\*15 foram fatores de risco para esclerose múltipla, que é também uma doença autoimune (2, 19, 37).

O alelo HLA-DRB1\*01 foi fator de proteção para o LES em coreanos (22). Os resultados deste estudo confirmaram esse dado.

Além desse, o alelo HLA-DRB1\*04 foi fator de proteção para o LES neste estudo. Usualmente, a literatura aponta o alelo HLA-DRB1\*04, com frequência menor no grupo de pacientes com LES, sendo, por vezes, um fator de proteção. Estudos com noruegueses, coreanos, e jamaicanos incluem-se nesta categoria. Em outras populações: húngaros, tailandeses e mexicanos esse alelo HLA-DRB1\*04, sua variante HLA-DRB1\*0406 ou haplótipo que o contém foram menos frequentes no grupo com LES, porém não houve significância estatística. Assim, os resultados deste trabalho, referentes ao alelo HLA-DRB1\*04, coincidem com achados em outras populações (19, 22, 23, 25, 26, 29).

Pelo exposto, os dados referentes à genética do LES mostraram-se condizentes com estudos anteriores: o alelo HLA-DRB1\*15 foi fator de risco para o LES e os alelos HLA-DRB1\*01 e HLA-DRB1\*04, fatores de proteção.

Os mecanismos implicados nessas associações não estão elucidados. Estudos epidemiológicos de associação entre genes e doenças não permitem a definição desses mecanismos, mas possibilitam uma triagem de genes como fatores de risco ou fatores de proteção. Ou seja: são relevantes porque definem alelos como marcadores moleculares de susceptibilidade ou de resistência à doença em questão. Esses alelos, uma vez consagrados na literatura, podem ser utilizados na prática clínica, contribuindo à prevenção, ao diagnóstico e tratamento precoces. Além disso, podem vir a embasar novos estudos relacionados aos mecanismos fisiopatogênicos da doença com as moléculas codificadas por esses genes (10).

Na amostra analisada, o alelo HLA-DRB1\*03 foi mais frequente no grupo de pacientes; porém não houve significância estatística. Relatos prévios também apresentaram esse resultado: HLA-DRB1\*03 em hispânicos, húngaros e islandeses e DRB1\*0301 em tunisianos (16, 26-28). Na literatura consultada, todavia, o alelo HLA-DRB1\*0301 foi o mais frequentemente associado à susceptibilidade para o LES em grupos populacionais distintos: britânicos, caucasianos, mexicanos mestiços, caucasianos italianos, indianos, hispano-americanos, noruegueses e taiuaneses (7, 15-21).

De fato, o alelo HLA-DRB1\*03 é comumente descrito como fator de risco para o LES, sendo o marcador molecular mais importante em caucasianos com LES (17, 38). Esse alelo apresenta baixa frequência em populações africanas (7 a 10%) comparadas com europeias (13%) (7). Neste estudo, apresentou frequência maior no grupo de pacientes que nos controles, porém, a diferença não foi significativa. O fato de a população maranhense ser miscigenada, havendo também negros e indígenas em sua composição, pode ter influenciado o resultado.

Neste trabalho, o alelo HLA-DRB1\*08 também apresentou uma frequência maior no grupo LES, porém, não houve significância estatística. Estudos de associação entre o gene HLA-DRB1\* e o LES apontam resultados discrepantes ao analisarem o alelo HLA-DRB1\*08. Foi fator de risco para o LES em hispano-americanos, mas não em espanhóis do norte. Em outro estudo, com hispânicos, esse alelo também foi fator de risco para o lúpus. A especificidade alélica DRB1\*0802 foi fator de proteção para o LES em mexicanos. Diferentemente, em tunisianos, verificou-se uma frequência menor de HLA-DRB1\*0801 no grupo com LES, porém sem significância estatística. Em britânicos, essa variante também não foi associada à susceptibilidade para o LES (7, 15, 16, 25, 28).

Esse resultado pode ser atribuído ao fato de que haplótipos com o alelo HLA-DRB1\*08 são relativamente raros. No Brasil, a frequência de especificidades desse alelo



variou de 0,005 a 0,030. No Maranhão, entre os dez alelos HLA-DRB1\* identificados, foi o segundo menos frequente (0,034), perdendo apenas para o HLA-DRB1\*16 (38-40).

Os resultados concernentes aos alelos HLA-DRB1\*03 e HLA-DRB1\*08 podem também estar relacionados a uma limitação do estudo: o tamanho amostral pequeno. Ressalta-se que o LES é uma doença rara e como tal, amostras de conveniência constituem a alternativa para pesquisas. Estudos similares também apresentaram amostras pequenas: na África do Sul: 49 casos e 87 controles; no México: 81 casos e 99 controles; na Jamaica: 82 casos e 75 controles (14, 17, 29).

Estudos de associação entre genes HLA-DRB1\* e LES têm apresentado diferentes frequências dos alelos residentes nesse loco, devido às diferenças interétnicas em vários grupos populacionais, havendo inclusive divergências entre autores. Essa distribuição díspare possibilita múltiplos resultados a esses estudos, os quais abrangem: alelos fatores de risco para o LES; alelos com frequência marginalmente elevada no grupo de pacientes; alelos com frequência aumentada nesse grupo, porém, sem significância estatística; alelos com frequência menor em pacientes, também sem significância estatística ou alelos fatores de proteção ao LES.

Por outro lado, o estudo do LES em diferentes subgrupos étnicos permite melhor identificar os genes, possivelmente associados com a doença. A etnicidade tem, assim, um importante papel na susceptibilidade para o lúpus, o que faz com que estudos em outras populações caracterizadas geneticamente sejam imprescindíveis (14, 17).

Ratifica-se com este trabalho a necessidade de investigar populações distintas, em especial como a maranhense, integrante da população brasileira, que é caracterizada por uma alta taxa de miscigenação entre europeus, representados principalmente pelos colonizadores portugueses; africanos e ameríndios autóctones. Grupos miscigenados apresentam uma diversidade alélica própria, a qual, se, por um lado, dificulta a identificação das associações

gênicas com doenças, por outro, possibilita a descoberta de novas associações ou confirmação daquelas já existentes (9,10, 14, 30).

Este estudo teve como objetivos identificar fatores genéticos e demográficos do LES: uma doença complexa, crônica, multissistêmica, multifatorial, associada a múltiplos genes polimórficos, com distribuição mundial, atingindo todas as etnias, em várias faixas etárias e cuja etiologia e cura são ignoradas. Buscou-se especialmente, contribuir com a literatura, na identificação das bases moleculares do LES, o que, por sua vez, é importante para medidas futuras de prevenção, diagnóstico e tratamento (1,10).

Em síntese, as contribuições deste trabalho foram as seguintes: 1) o alelo HLA-DRB1\*15 foi fator de risco para o LES na amostra de maranhenses; 2) os alelos HLA-DRB1\*01 e HLA-DRB1\*04 foram fatores de proteção; 3) Os alelos HLA-DRB1\*03 e HLA-DRB1\*08 foram mais frequentes no grupo LES que no grupo controle; no entanto, sem significância estatística; 4) mostra que estudos em populações miscigenadas permitem identificar associações já descritas em grupos étnicos homogêneos; 5) confirma a relevância da etnicidade para a susceptibilidade ao LES e 6) os dados demográficos detectados ratificam aspectos epidemiológicos da doença, especialmente o elevado percentual de relatos sobre familiares com LES na amostra de pacientes, o que é mais um indicativo do componente genético da doença.

**REFERÊNCIAS**

1. BORBA E, LATORRE L, BRENOL J, KAYSER C, SILVA N, ZIMMERMAN A et al. Consenso de Lúpus Eritematoso Sistêmico. *Rev Bras Reumatol* 2008; 48: 196-207.
2. FERNANDO M, STEVENS C, WALSH E, JAGER P, GOYETTE P, PLENGE R, et al. Defining the Role of MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled Analysis. *PLOS Genetics* 2008; 4: 1-9.
3. ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
4. GABRIEL SE, MICHAUD K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 229-245.
5. SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. Principais doenças e orientações ao Paciente. Lúpus Eritematoso Sistêmico. <http://www.reumatologia.com.br/>; 2010.
6. VILAR MJP, SATO EI. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus* 2002; 11: 528-532.
7. FERNANDO M, STEVENS C, SABETI P, WALSH E, McWHINNIE A, SHAH A et al. Identification of Two Independent Risk Factors for Lupus within the MHC in United Kingdom Families. *PLOS Genetics* 2007; 3: 2109-2121.
8. KLEIN J, SATO A. The HLA System. First of two parts. *N Engl J Med* 2000; 7: 702-709.
9. DONADI E. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. *Medicina Ribeirão Preto* 2000; 33: 07-18.
10. ALVES C, SOUZA T, VEIGA S, ALVES C, TORALLES M, LEMAIRE D. Importância do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) em Pediatria. *Pediatria (São Paulo)* 2005; 27: 274-286.
11. VISENTAINER J, TSUNETO L, SERRA M, PEIXOTO P, PETZEL-ERLER M. Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern brazilian population. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30: 51-59.
12. CORGHI D, GONÇALES N, MARQUES S, GONÇALES Jr. F. Distribution of the human leukocyte antigen class II in brazilian patients with chronic hepatitis C virus infections. *Braz J Med Biol Res Online Ahead of Print*. <http://www.bjournal.com.br/>; 2009.
13. ALVES C, MEYER I, VIEIRA I, TORALLES MBP, MAIRE LE. Distribuição e frequência de alelos e haplótipos HLA em brasileiros com Diabetes Mellito tipo I. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2006; 50: 436-444.

14. RUDWALEIT M, TIKLY M, GIBSON K, PILE K, WORDSWORTH P. HLA Class II antigens associated with systemic lupus erythematosus in Black South Africa. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 678-80.
15. CALVO-ALÉN J, REVEILLE JD, RODRIGUEZ-VALVERDE V, McGWIN Jr. G, BAETHGE B, FRIEDMAN A et al. Clinical, immunogenetic and outcome features of Hispanic systemic lupus erythematosus patients of different ethnic ancestry. *Lupus* 2003; 12: 377-385.
16. REVEILLE J, MOULDS JM, AHN C, FRIEDMAN A, BAETHGE B, ROSEMAN J et al. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. The effects of HLA Class I, C4 and CR1 alleles, socioeconomic factors, and ethnicity at disease onset. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1161-1172.
17. VARGAS-ALARCÓN G, SALGADO N, GRANADOS J, GÓMEZ-CASADO E, MARTINEZ-LASO J, ALCOCER-VARELA J et al. Class II Allele and haplotype frequencies in mexican Systemic Lupus Erythematosus patients: The relevance of considering homologous chromosomes in determining susceptibility. *Hum Immunol* 2001; 62: 812-820.
18. MARCHINI M, ANTONIOLI R, LLEÓ A, BARILI M, CARONNI M, ORIGGI L et al. HLA Class II antigens associated with Lupus nephritis in Italian SLE patients. *Hum Immunol* 2003; 64: 462-468.
19. SMERDEL-RAMOYA, A.; FINHOLT, C.; LILLEBY, V.; GILBOE, I.-M.; HARBO, H.F.; MASLINSK, S.; FORRE, O.; THORSBY, E.; LIE, B.A. Systemic lupus erythematosus and the extended major Histocompatibility complex – evidence for several predisposing loci. *Rheumatology* 2005; 44: 1368-1373.
20. SHANKARKURMAR U, GHOSH K, BADAHERE SS, MOHANTY D. HLA-DRB1\*03 and DQB1\*0302 associations in a subset of patients severely affected with systemic lupus erythematosus from western India. *Ann Rheum Dis*, 2003; 62:92-93.
21. PAN, CF; WU, CJ; CHEN, HH; DANG, CW; CHANG, FM; LIU, HF; CHU, CC; LIN, M; LEE, YJ. Molecular analysis of HLA-DRB1 allelic association with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis in Taiwan. *Lupus* 2009; 18: 698-704.
22. LEE H, CHUNG Y, KIM T, KIM T, JUM J, JUNG S et al. Independent association of HLA-DR and FCγ receptor polymorphisms in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 2003; 42: 1501-1507.
23. CORTES L, BALTAZAR L, LOPEZ-CARDONA M, OLIVARES C, SALAZAR M, SANDOVAL L et al. HLA Class II haplotypes in mexican systemic lupus erythematosus patients. *Hum Immunol* 2004; 65: 1469-1476.
24. MOSAAD YM, HAMMAD A, YOUSSEF HM, ELHANBLY S. HLA-DRB1\*15 confers susceptibility to juvenile SLE but is not associated with disease presentation: an Egyptian Study. *Immunol Invest* 2010; 39, n. 3: 235-44 (Abstract).

25. SIRIKONG M, TSUCHIYA N, CHANDANAYINGYONG D, BEJRACHANDRA S, SUTHIPINITTHARM R, LUANGTRAKOOL K et al. Association of HLA-DRB1\*1502- DQB1\*0501 haplotype with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens* 2002; 59: 13-117.
26. ENDREFFY E, KOVÁCS A, KOVÁCS L, POKORNY G. HLA class II allele polymorphisms in Hungarian patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 1017-1018.
27. STEISSON K, JÓNSDÓTTIR S, ARASON G, KRISTJÁNSDÓTTIR, FOSSDAL R, SKÁFTADÓTTIR I et al. A study of the association of HLA DR, DQ and complement C4 alleles with systemic lupus erythematosus in Iceland. *Ann Rheum Dis.* 1998; 57: 503-505.
28. AYED K, GORGI Y, AYED-JENDOUBI S, BERDI R. The involvement of HLA-DRB1\*, -DQA1\*, -DQB1\* and complement C4A loci in diagnosing systemic lupus erythematosus among Tunisians. *Ann Saudi Med* 2004; 24: 31-35 (Abstract).
29. CHRISTIAN N, SMIKLE M, DeCEULAER K, DANIELS L, WALRAVENS M, BARTON E. Antinuclear antibodies and HLA Class II Alleles in Jamaicans Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *West Indian Med* 2007; 56: 130-133.
30. PARRA F, AMADO R, LAMBERTUCCI J, ROCHA J, ANTUNES C, PENA D. Color and Genomic ancestry in Brazilians. *PNAS* 2003; 100: 177-182.
31. HONCHBERG MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1725.
32. DEAN AG, DEAN JA, COULOMBIER D. et al. Epi Info, Version 6: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. Atlanta, Georgia, USA: Centers for Disease Control and Prevention, 1994.
33. STATA STATISTICAL SOFTWARE [computer program] Release 9.0. Texas: College Stations, Stata Corporation, 2001.
34. EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN: a software for population genetics analysis, version 3.1. Genetics and Biometry laboratories, Dept. of Anthropology, University of Genebra, 2006.
35. SESTAK AL, NATH SK, SAWALHA AH, HARLEY JB. Current status of lupus genetics. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: 210-219.
36. THE INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS INFORMATION SYSTEM® IMGT HLA Databases. Statistics. <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>; 2010.
37. LIPHAUS B, KISS M, GOLDBERG A. HLA-DRB1 alleles in juvenile-onset receptor systemic lupus erythematosus: renal histologic class correlations. *Braz J Med Biol Res* 2007; 40: 591-1597.

38. GRAHAN R, ORTMANN W, LANGEFELD C, JAWAHEER D, SELBY S, RODINE P et al. Visualizing human leucocyte antigen classe II risk haplotypes in Systemic Lupus Erythematosus. *Am J Hum Genet* 2002; 71: 543-553.
39. MIDDLETON, D.; MENCHACA, L.; ROOD, H.; KOMEROSFSKY, R. Tissue Antigens, v. 61, p. 403-407, 2003. New Allele Frequency Database: <http://www.allelefreqencies.net>. Middleton D, Menchaca L, Rood H, Komerofsky R. *Tissue Antigens* 2003, 61, 403-407.
40. FERREIRA, F. L. **Polimorfismo genético do Sistema HLA em uma amostra de Doadores Voluntários de Medula Óssea do Maranhão.** 2006, 136 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2006.

**TABELA 1 – FREQUÊNCIA DOS DADOS DEMOGRÁFICOS NO GRUPO LES E NO GRUPO CONTROLE. SÃO LUÍS, MARANHÃO, 2010.**

DADOS DEMOGRÁFICOS	LES (n=80)	CONTROLES (n=80)	p
	N (%)	N (%)	
<b>Sexo</b>			
Feminino	72(90,00)	72(90,00)	-
Masculino	08(10,00)	08(10,00)	-
<b>Procedência</b>			
São Luís	33(41,25)	43(53,75)	0,15
Interior	47(58,75)	37(46,25)	
<b>Grupo Étnico</b>			
Mestiços	47(58,80)	58(72,60)	0,09
Caucasiano/Branco	14(17,40)	14(17,40)	0,08
Negro	19(23,80)	08(10,00)	0,03
Oriental	00	00	-
<b>Idade</b>			
Amplitude	(14-56)	(24-65)	
Média ±DP	29,91 ±08,64	38,96±10,09	
<b>Idade ao Diagnóstico</b>			
Amplitude	(12-50)	—	-
Média ±DP	25,06±8,50	—	-

Nota: LES = Lúpus Eritematoso Sistêmico; N=numérica

**TABELA 2 - FREQUÊNCIA DE FAMILIARES COM LES SEGUNDO RELATO DOS PACIENTES. SÃO LUÍS, MARANHÃO, 2010.**

FAMILIARES COM LES	N	%
Filha	01	01,25
Irmã	03	03,75
Mãe	01	01,25
Prima	09	11,25
Sobrinha	01	01,25
Tia	01	01,25
Tia-avó	01	01,25
Nenhum	63	78,75
<b>TOTAL</b>	<b>80</b>	<b>100,00</b>

Nota: LES = Lúpus Eritematoso Sistêmico; N=numérica



**TABELA 3 – FREQUÊNCIA ALÉLICA PARA O LOCO HLA-DRB1\* NO GRUPO LES E NO GRUPO CONTROLE, SÃO LUÍS, MARANHÃO, 2010.**

ALELO HLA-	LES (n=80)		CONTROLE (n=80)		OR (IC 95%)	p
	N	%	N	%		
DRB1*01 <sup>a</sup>	6	3,75	24	15,00	0,18 (0,59 – 0,52)	0,0003
DRB1*03 <sup>b</sup>	18	11,25	11	6,88	1,82 (0,74 – 4,60)	0,1508
DRB1*04 <sup>a</sup>	13	8,12	25	15,62	0,42 (0,18 – 0,96)	0,0258
DRB1*07	16	10,00	15	9,38	1,08 (0,45 – 2,57)	0,8415
DRB1*08 <sup>b</sup>	19	11,88	9	5,62	2,45 (0,96 – 6,61)	0,0375
DRB1*09	7	4,38	6	3,75	1,18 (0,32 – 4,47)	0,7723
DRB1*10	2	1,25	6	3,75	0,31 (0,30 – 1,85)	0,2765
DRB1*11	13	8,12	11	6,88	1,21 (0,46 – 3,22)	0,6579
DRB1*12	2	1,25	2	1,25	1,00 (0,07 – 9,98)	1,0000
DRB1*13	27	16,88	25	15,62	1,12 (0,48 – 2,04)	0,7357
DRB1*14	2	1,25	8	5,00	0,23 (0,23 - 1,21)	0,0500
DRB1*15 <sup>c</sup>	29	18,12	10	6,25	3,98 (1,68 – 9,93)	0,0005
DRB1*16	6	3,75	8	5,00	0,72 (0,19 – 2,53)	0,5758
TOTAL	160	100,00	160	100,00		

Nota: <sup>a</sup> Fator de proteção para o LES; <sup>b</sup> frequência maior no grupo LES sem significância estatística; <sup>c</sup> fator de risco para o LES; N=numérica; OR=Odds Ratio; IC=Intervalo de Confiança; LES=Lúpus Eritematoso Sistêmico.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos mostraram-se condizentes com estudos anteriores: confirmou-se o alelo HLA-DRB1\*15 como fator de risco para o LES e os alelos HLA-DRB1\*01 e HLA-DRB1\*04 como fatores de proteção.

De acordo com a literatura, mecanismos implicados nessas associações não estão elucidados. Estudos epidemiológicos de associação entre genes e doenças não permitem a definição desses mecanismos, mas possibilitam uma triagem de genes como fatores de risco ou fatores de proteção. Ou seja: são relevantes porque definem alelos como marcadores moleculares de susceptibilidade ou de resistência à doença em questão. Esses alelos, uma vez consagrados na literatura, podem ser utilizados na prática clínica, contribuindo à prevenção, ao diagnóstico e tratamento precoces. Além disso, podem vir a embasar outros estudos relacionados aos mecanismos fisiopatogênicos da doença com as moléculas codificadas por esses genes (ALVES et al., 2005).

O alelo HLA-DRB1\*03 é frequentemente descrito como alelo de susceptibilidade para o LES, sendo o marcador molecular mais importante em caucasianos (GRAHAM et al., 2002; VARGAS-ALARCON et al., 2001). Esse alelo apresenta baixa frequência em populações africanas (7 a 10%) comparadas com europeias (13%) (FERNANDO et al., 2007). Neste estudo, apresentou frequência maior no grupo de pacientes que no grupo controle, porém, a diferença não foi significativa, o que também já fora descrito. O fato de a população maranhense ser miscigenada, havendo também negros e indígenas em sua composição, pode ter influenciado o resultado.

O achado referente ao alelo HLA-DRB1\*08 - maior frequência no grupo de pacientes, sem significância estatística - não foi observado na literatura consultada. Esse dado pode ser atribuído ao fato de que haplótipos com o alelo HLA-DRB1\*08 serem relativamente raros (GRAHAM et al., 2002). Segundo relatos anteriores, a frequência de especificidades desse alelo, no Brasil, variou de 0,005 a 0,030 (MIDDLETON, 2003), mais precisamente no Maranhão foi 0,0342 (FERREIRA et al., 2006).

Os resultados concernentes a esses alelos podem também estar relacionados a uma limitação do estudo: o tamanho amostral pequeno. Ressalta-se que o LES é uma doença rara e como tal, amostras de conveniência constituem a alternativa para pesquisas. Estudos similares foram realizados também com amostras pequenas: na África do Sul, com 49 casos e 87 controles (RUDWALEIT et al., 1995); no México: 81 casos e 99 controles (VARGAS-

ALARCÓN et al., 2001); nos EUA, com 61 casos e 89 controles (EROGLU; KOHLER, 2002); na Jamaica: com 82 casos e 75 controles (CHRISTIAN et al., 2007).

Apesar de ser o padrão de investigação em estudos epidemiológicos, considera-se questionável a identificação da etnia por meio da autodeclaração, por se tratar de uma avaliação subjetiva, passível da influência de valores culturais e preconceitos do declarante. A literatura já sugere a definição da etnia por meio, também, de marcadores genéticos de ancestralidade (ALVES et al., 2006). Além disso, particularmente na população brasileira altamente miscigenada, com raízes européias, africanas e ameríndias, a cor da pele determinada pela avaliação física, em nível individual, é um critério pobre de ancestrais genômicos africanos (PARRA et al., 2003).

Ratifica-se com este estudo a idéia de que é necessário investigar populações distintas, principalmente miscigenadas como a maranhense, para verificar a ocorrência de novas associações ou confirmar aquelas já descritas (ALVES et al., 2005). Estudo anterior evidencia a miscigenação local, na população da capital São Luís, composta por europeus (42%), ancestrais negros africanos (19%) e índios (39%) (FERREIRA et al., 2005).

Este estudo teve como objetivos identificar fatores genéticos e demográficos do LES: uma doença complexa, crônica, multissistêmica, multifatorial, associada a múltiplos genes polimórficos, com distribuição mundial, atingindo todas as etnias, em várias faixas etárias e cuja etiologia e cura são ignoradas. Buscou-se especialmente, contribuir com a literatura, na identificação das bases moleculares do LES, o que, por sua vez, é importante para medidas futuras de prevenção, diagnóstico e tratamento (BORBA et al., 2008; ALVES et al., 2006).

Em síntese, as contribuições deste trabalho foram as seguintes: 1) o alelo HLA-DRB1\*15 foi fator de risco para o LES na amostra de maranhenses; 2) os alelos HLA-DRB1\*01 e HLA-DRB1\*04 foram fatores de proteção; 3) Os alelos HLA-DRB1\*03 e HLA-DRB1\*08 foram mais frequentes no grupo LES que no grupo controle; no entanto, sem significância estatística; 4) mostra que estudos em populações miscigenadas permitem identificar associações já descritas em grupos étnicos homogêneos; 5) confirma a relevância da etnicidade para a susceptibilidade ao LES e 6) os dados demográficos detectados ratificam aspectos epidemiológicos da doença, especialmente o elevado percentual de relatos sobre familiares com LES na amostra de pacientes, o que é mais um indicativo do componente genético da doença.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 6.ed. 2008. 564 p.

ALVES, C.; SOUZA, T.; VEIGA, S.; ALVES, C.; TORALLES, M. B.; LEMAIRE, D. Importância do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) em Pediatria. **Pediatria (São Paulo)**, v. 27, n. 4, p. 274-286, 2005.

ALVES, C; MEYER, I.; TORALLES, M. B. P. ; SANTIAGO, M. B. Complexo Principal de Histocompatibilidade: sua participação na patogênese das doenças reumáticas autoimunes. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde (RBPS)**, v. 19, n. 03, p.155-163, 2006.

ALVES, C.; MEYER, I.; VIEIRA, I.; TORALLES, M. B. P.; MAIRE L. E., D. Distribuição e Frequencia de Alelos e Haplótipos HLA em Brasileiros com Diabetes Melito Tipo I. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 3, p. 436-444, 2006

AYED, K.; GORGI, Y.; AYED-JENDOUBI.; BERDI, R. The involvement of HLA-DRB1\*, -DQA1\*, -DQB1\* and complement C4A loci in diagnosing systemic lupus erythematosus among Tunisians. **Ann Saudi Med**, v. 24, n. 1, p.31-35, 2004 (Resumo).

BUGNI, V. M.; TERRERI, M. T.; NUNES, N.A.; LEN, C. A.; BARBOSA C. M. P.; HILÁRIO, M. O. E. Dress syndrome and juvenile systemic lupus erythematosus in a two year old girl. **Rev Bras Reumatol**, v. 48, n. 4, p.256-260, 2008.

CALVO-ALÉN, J.; REVEILLE, J. D.; RODRIGUEZ-VALVERDE, V.; McGWIN Jr., G.; BAETHGE, B. A.; FRIEDMAN, A. W.; ALÁRCÓN, G. S. Clinical, immunogenetic and outcome features of Hispanic systemic lupus erythematosus patients of different ethnic ancestry. **Lupus**, v. 12, p. 377-385, 2003.

CAZNOCH, C. J.; ESMANHOTTO, L.; SILVA, M. B.; SKARE, T. L.. Padrão de comprometimento articular em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e sua associação com presença de fator reumatóide e hiperelasticidade. **Rev Bras Reumatol**, v. 46, n. 4, p. 261-265, 2006.

CORGHI, D. B.; GONÇALES, N. S. L.; MARQUES, S. B. D.; GONÇALES Jr., F.L. Distribution of the human leukocyte antigen class II in Brazilian patients with chronic hepatitis C virus infections. . **Braz J Med Biol Res Online Ahead of Print**. Disponível em <http://www.bjournal.com.br>. Acesso: set/2009.

CORTES, L. M.; BALTAZAR, L. M.; CARDONA-LOPEZ, M. G.; OLIVARES, N.; RAMOS, C.; SALAZAR, M.; SANDOVAL, L.; LORENZ, M. G. O.; RANAJIT, C.; PATERSON, A. D.; RIVAS, F. HLA Class II haplotypes in mexican systemic lupus erythematosus patients. **Human Immunology**, v. 65, p. 1469-1476, 2004.

CHRISTIAN, N.; SMIKLE, M. F.; DeCEULAER, K.; DANIELS, L.; WALRAVENS, M. J.; BARTON, E. N. Antinuclear antibodies and HLA Class II Alleles in Jamaicans Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **West Indian Med**, v. 56, n. 2, p.130-133, 2007.

DEAN A. G.; DEAN J.A., COULOMBIER, D. et al. Epi Info, Version 6: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers. Atlanta, Georgia, USA: Centers for Disease Control and Prevention, 1994.

DONADI, E. A. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 33, p. 07-18, 2000.

ENDREFFY, E.; KOVÁCS, A., KOVÁCS, L.; POKORNY, G. HLA class II allele polymorphisms in Hungarian patients with systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, v. 62, p. 1017-1018, 2003.

EROGLU, G.E.; KOHLER, P.F. Familial systemic lupus erythematosus: the role of genetic and environmental factors. **Ann Rheum Dis**, v. 61, p. 29-31, 2002.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN: a software for population genetics analysis, version 3.1. Genetics and Biometry laboratories, Dept. of Anthropology, University of Geneva, 2006.

FERNANDO, M. M. A.; STEVENS, C. R.; SABETI, P. C.; WALSH, E. C.; McWHINNIE, A. J. M.; SHAH, A.; GREEN, T.; RIOUX, J. D.; VYSE, T. J. Identification of Two Independent Risk Factors for Lupus within the MHC in United Kingdom Families. **PLOS Genetics**, v. 3, p. 2109-2121, 2007.

FERNANDO, M.M.A.; STEVENS, C.R.; WALSH, E.C.; JAGER, P.L.; GOYETTE, P.; PLENGE, R.M.; VYSE, T.J.; RIOUX, J.D. Defining the Role of MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled Analysis. **PLOS Genetics**, v. 4, p. 1-9, 2008.

FERREIRA, F.L. LEAL-MESQUITA, E.R.; SANTOS, E.M.B.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K. Genetic Characterization of the population of São Luís, MA, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 1, p. 22-31, 2005.

FERREIRA, F. L. **Polimorfismo genético do Sistema HLA em uma amostra de Doadores Voluntários de Medula Óssea do Maranhão**. 2006, 136 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2006.

GABRIEL, S. E; MICHAUD, K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. **Arthritis Research & Therapy**, v. 11, n. 3, p. 229-245, 2009.

GILMORE, E. The Effects of Lupus on Skin and Body. Disponível em: [http://www.skinsight.com/info/health\\_article/2009/10/01/effects-lupus-skin-and-body](http://www.skinsight.com/info/health_article/2009/10/01/effects-lupus-skin-and-body). Acesso em: junho/2010.

GRAHAN, R. R.; ORTMANN, W. A.; LANGEFELD, C. D.; JAWAHEER, D.; SELBY, S. A.; RODINE, P. R.; BAECHLER, E. C.; ROHLF, K. E.; SHARK, K. B.; ESPE, K. J.; GREEN, L. E.; NAIR, R. P.; STUART, P. E.; ELDER, J. T.; KING, R. A.; MOSER, K. L.; GAFFNEY, P. M.; BUGAWAN, T. L.; ERLICH, H. A.; RICH, S. S.; GREGERSEN, P. K.; BEHRENS, T. W. Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in Systemic Lupus Erythematosus. **Am J Hum Genet**, v. 71, p.543-553, 2002.

GRAHAN, R. R.; ORTMANN, W. A.; RODINE, P. R.; ESPE, K. J.; LANGEFELD, C.; LANGE, E.; WILLIAMS, A.; BECK, S.; KYOGOKU, C.; MOSER, K.; GAFFNEY, P. M.; GREGERSEN, P. K.; CRISWELL, L. A.; HARLEY, J. B.; BEHRENS, T. W. Specific combinations of HLA-DR2 and DR3 class II haplotypes contribute graded risk for disease susceptibility and autoantibodies in human SLE. **Eur J Hum Genet**, v. 15, p. 823-830, 2007.

HLA NOMENCLATURE. Nomenclature for Factors of the HLA System. Disponível em: <http://hla.alleles.org/> Acesso em: maio/2010.

HONCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 40, p. 1725, 1997.

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA System. First of two parts. **N Engl J Med**, v.7, p. 702-709, 2000.

LEE, H. S.; CHUNG, Y. H.; KIM, T. G.; KIM, T. H.; JUM, J. B.; JUNG, S.; BAE, C. S.; YOO, D. H. Independent association of HLA-DR and FC $\gamma$  receptor polymorphisms in Korean patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v. 42, p. 1501-1507, 2003.

LIPHAUS, B. L.; KISS, M. H. B.; GOLDBERG, A. C. HLA-DRB1 alleles in juvenile-onset receptor systemic lupus erythematosus: renal histologic class correlations. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, p. 591-1597, 2007.

MARCHINI, M.; ANTONIOLI, R.; LLEÓ, A.; BARILI, M.; CARONNI, M.; ORIGGI, L.; VANOLI, M.; SCORZA, R. HLA Class II antigens associated with Lupus nephritis in Italian SLA patients. **Human Immunology**, v. 64, p.462-468, 2003.

McHUGH, N. J.; OWEN, P.; COC, B.; DUNPHY, K.; WELSH, K. CPH class II, tumor necrosis factor  $\alpha$  gene haplotype associations with serological subsets of systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, v. 65, p.488-494, 2005.

MIDDLETON, D.; MENCHACA, L.; ROOD, H.; KOMEROSFSKY, R. New Allele Frequency Database: <http://www.allelefreqencies.net>. **Tissue Antigens**, v. 61, p. 403-407, 2003.

MOSAAD, Y. M.; HAMMAD, A.; YOUSSEF, H. M.; ELHANBLY, S. HLA-DRB1\*15 confers susceptibility to juvenile SLE but is not associated with disease presentation: an Egyptian Study. **Immunol Invest**, v. 39, n. 3, p. 235-44, 2010 (Resumo).

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Entrez gene. HLA-DRB1 Major Histocompatibility Complex, class II, DR beta 1 [ *Homo sapiens* ] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3123>. Acesso em: maio/2010.

PAN, C. F.; WU, C. J.; CHEN, H. H.; DANG, C.W.; CHANG, F.M.; LIU, H. F; CHU, C. C.; LIN, M.; LEE, Y. J. Molecular analysis of HLA-DRB1 allelic association with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis in Taiwan. **Lupus**, v. 18, p. 698-704, 2009.

PARRA, F. C.; AMADO, R. C.; LAMBERTUCCI, J. R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C. M.; PENA, D. J. Color and Genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n.1, p.177-182, 2003.

REVEILLE, J. D.; MOULDSM J. M.; AHN, C.; FRIEDMAN, A.W.; BAETHGE,B.; ROSEMAN, J.; STRAATION, K.V.; ALÁRCON, G. S. Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. The Effects of HLA Class I, C4 and CR1 Alleles, Socioeconomic Factors, and Ethnicity at Disease Onset. **Arthritis & Rheumatism**, v. 41, n. 7, p. 1161-1172, 1998.

RUDWALEIT, M.; TIKLY, M.; GIBSON, K.; PILE, K.; WORDSWORTH, P. HLA Class II antigens associated with systemic lupus erythematosus in Black South Africa. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 54, p. 678-680, 1995.

SESTAK, A. L.; NATH, S. K.; SAWALHA, A. H.; HARLEY, J. B. Current status of lupus genetics. *Arthritis Research and Therapy*, v. 9, p. 210-219, 2007.

SHANKARKURMAR, U.; GHOSH, K.; BADAKERE, S.S.; MOHANTY, D. HLA-DRB1\*03 and DQB1\*0302 associations in a subset of patients severely affected with systemic lupus erythematosus from western India. **Ann Rheum Dis**, v. 62, p. 92-93, 2003.

SIRIKONG, M.; TSUCHIYA, N.; CHANDANAYINGYONG, D.; BEJRACHANDRA, S.; SUTHIPINITTHARM, R.; LUANGTRAKOOL, K.; SRINAK, D.; THONGPRADIT, R.; SIRIBOONRIT, U.; TOKUNAGA, K. Association of HLA-DRB1\*1502- DQB1\*0501 haplotype with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. **Tissue Antigens**, v. 59, p. 113-117, 2002.

SMERDEL-RAMOYA, A.; FINHOLT, C.; LILLEBY, V.; GILBOE, I.-M.; HARBO, H.F.; MASLINSK, S.; FORRE, O.; THORSBY, E.; LIE, B.A. Systemic lupus erythematosus and the extended major Histocompatibility complex – evidence for several predisposing loci. **Rheumatology**, v. 44, p. 1368-1373, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. Principais doenças e orientações ao Paciente. Lúpus Eritematoso Sistêmico. Disponível em: <http://www.reumatologia.com.br/>. Acesso em: março/2010.

STATA STATISTICAL SOFTWARE [computer program] Release 9.0. Texas: College Stations, Stata Corporation, 2001.

STEISSON, K.; JÓNSDÓTTIR, S; ARASON, G. J; KRISTJÁNSDÓTTIR, FOSSDAL, R.; SKÁFTADÓTTIR, I; ARNASON, A. A study of the association of HLA DR, DQ and complement C4 alleles with systemic lupus erythematosus in Iceland. **Ann Rheum Dis**. v. 57, p. 503-505, 1998.

THE INTERNATIONAL IMMUNOGENETICS INFORMATION SYSTEM® IMGT HLA Databases. Statistics. Disponível em <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>. Acesso em maio/2010.

VISENTAINER, J. E. L.; TSUNETO, L. T.; SERRA, M. F.; PEIXOTO, P. R. F.; PETZEL-ERLER, M. L. Association of leprosy with HLA-DR2 in a Southern Brazilian population. **Braz J Med Biol Res**, v.30, n.1, p.51-59, 1997.

VARGAS-ALARCÓN, G.; SALGADO, N.; GRANADOS, J.; GÓMEZ-CASADO, E.; MARTINEZ-LASO, J.; ALCOCER-VARELA, J.; ARNAIZ-VILLENA, A.; ALARCÓN-SEGOVIA D. Class II Allele and haplotype frequencies in mexican Systemic Lupus Erythematosus patients: The relevance of considering homologous chromosomes in determining susceptibility. **Human Immunology**, v. 62, p. 812-820, 2001.

VILAR, M. J. P.; SATO, E. I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). **Lupus**, v.11, p. 528-532, 2002.



**ANEXO**

## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

### **Scope and policy**

The purpose of the BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH is to publish the results of original experimental research that contribute significantly to knowledge in medical and biological sciences. Preference will be given to manuscripts that develop new concepts or experimental approaches and are not merely repositories of data. Papers that report negative results require special justification for publication. Methodological papers shall be considered for publication provided they describe new principles or a significant improvement of an existing method.

### **Papers that will not be accepted for publication**

- Studies on people not approved by an accredited Ethics Committee or without written informed consent from the subject or legal guardian
- Studies on animals not approved by an accredited Ethics and Animal Care Committee
- Manuscripts that report preliminary results or only confirm previously reported results.
- Manuscripts that describe the pharmacodynamics, bioavailability and toxicity of drugs in people or animals
- Manuscripts that deal with transcultural adaptation and validation of instruments of measurements.
- Manuscripts that translate a text published in another language and validate it on local patients.
- Manuscripts that use questionnaires translated from the language of another country and their validation in local patients.

### **Page charges**

The authors are responsible for "publication charges" of all accepted papers. Publication charges will be billed to the Corresponding Author when paper is accepted.

For papers submitted after January 5, 2009, the charge is R\$1.250,00/ paper for Brazilian authors and US\$550,00/paper for authors outside Brazil and is independent of the length of the paper.

The Journal does not provide reprints to corresponding authors. They will receive a CD containing the issue in which the paper is published. There is no charge for figures in color.

Please contact Reinaldo de Souza ([bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br)) if you have any questions.

### **Manuscript criteria and information**

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research is a peer-reviewed electronic journal published monthly by the Associação Brasileira de Divulgação Científica (ABDC).

Submission of a manuscript to the Brazilian Journal implies that the data have not been published previously and will not be submitted for publication elsewhere while the manuscript is under review.

The following represent "prior publication": any printed material in excess of 500 words describing results or methods of a submitted/in press manuscript; published tables or illustrations that duplicate the content of a manuscript; electronic manuscripts or posters available via the Internet. When part of the material in a manuscript has been presented as a preliminary communication or in an unrefereed symposium, this should be cited as a footnote on the title page and a copy should accompany the submitted manuscript.

### **Manuscript Submission**

Complete the form for submission at <http://www.bjournal.com.br/> and send the manuscript as an attachment to the cover letter to [bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br) or [bjournal@terra.com.br](mailto:bjournal@terra.com.br).

The cover letter should contain the following information:

- Title of article.
- Name(s) of all author(s).
- A statement signed by the corresponding author that written permission has been obtained from all persons named in the acknowledgements should be sent by fax to +55-16-3633-3825 or 3630-2778.
- If a version of the manuscript has been previously submitted for publication to another journal, include comments from the peer reviewers and indicate how the authors have responded to these comments.
- Papers in the area of Clinical Investigation should include a statement indicating that the protocol has been approved by the Hospital Ethics Committee (Hospital with which at least one of the authors is associated) and that written informed consent was obtained from all participants.
- Animal experimentation should be carried out according to institutional guidelines for experimental use of animals.
- The authors should obtain written permission to reproduce figures and tables from other sources.

### **Copyright**

Most of the provisions of the United States Copyright Act of 1976 became effective on Jan. 1, 1978. All published manuscripts become the permanent property of the Brazilian Journal of Medical and Biological Research and may not be republished without written permission from the Brazilian Journal.

All manuscripts must be accompanied by the following written statement, signed by the authors and sent by regular mail:

"The undersigned author(s) transfer all copyright ownership of the manuscript (title of article) to the Brazilian Journal of Medical and Biological Research, in the event the work is published. The undersigned warrant(s) that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, and has not been previously published. The author(s) confirm that they have reviewed and approved the final version of the manuscript."

## **Paper Format**

Eight to nine issues per year of the Brazilian Journal are organized into sections of **Biosciences** and authors should specify in the cover letter the specific section in which they prefer to publish their paper.

- Biochemistry and Molecular Biology
- Cell Biology
- Experimental Biology
- Immunology
- Neurosciences and Behavior
- Pharmacology
- Physiology and Biophysics

Three to four issues per year are dedicated to **Clinical Investigation** and authors should specify in the cover letter the specific section in which they prefer to publish their paper.

- Analytical, diagnostic and therapeutic techniques and instruments
- Blood, immunology and organ transplantation
- Cardiovascular, respiratory and sport medicine
- Digestive system
- Endocrine diseases, nutrition and metabolism
- Environmental factors of diseases
- Health care and community medicine
- Infectious agents and diseases
- Kidney and extracellular environment
- Neonatal medicine, growth and development
- Oncology
- Psychological processes, behavior and mental diseases
- Reproductive medicine
- Skeletal, muscle and nervous systems
- Skin and connective tissue diseases
- Surgical procedures, anesthesia and analgesia.

**Full-length Paper.** Each manuscript should clearly state its objective or hypothesis; the experimental design and methods used (including the study setting and time period, patients or participants with inclusion and exclusion criteria, or data sources and how these were selected for the study); the essential features of any interventions; the main outcome measures; the main results of the study, and a section placing the results in the context of published literature. A full-length paper should contain:

- an abstract of no more than 250 words
- no more than 6 key words
- a running title to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces
- the text should be divided into separate sections (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion), without a separate section for conclusions
- no more than 40 references (no exceptions will be made)
- authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a full-length paper

**Short Communication.** A short communication is a report on a single subject which should be concise but definitive. The scope of this section is intended to be wide and to encompass methodology and experimental data on subjects of interest to the readers of the Journal. A short communication should contain:

- an abstract of no more than 250 words
- no more than 6 key words
- a running title to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces
- text not exceeding 12 double-spaced typed pages of 23 lines each
- a maximum of 2 figures or tables (or one of each)
- no more than 20 references (no exceptions will be made)
- the text should be divided into separate sections (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion), without a separate section for conclusions
- authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a short communication

**Review Article.** A review article should provide a synthetic and critical analysis of a relevant area and should not be merely a chronological description of the literature. A review article by investigators who have made substantial contributions to a specific area in medical and biological sciences will be published by invitation of the Editors. However, an outline of a review article may be submitted to the Editors without prior consultation. If it is judged appropriate for the Journal, the author(s) will be invited to prepare the article for peer review. A minireview is focused on a restricted part of a subject normally covered in a review article. A minireview and review article should contain:

- an abstract of 250 words or less
- no more than 6 key words
- a running title to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces
- no more than 60 references (no exceptions will be made)
- the text may be divided into sections with appropriate titles and subtitles
- authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a review article

**Concepts and Comments.** The Concepts and Comments section provides a platform for readers to present ideas, theories and views. Contributions should be presented with an abstract, 6 key words, a running title, no more than 20 references and up to 2 tables or figures.

**Case Report.** A case report should have at least one of the following characteristics to be published in the Journal:

- special interest to the clinical research community
- a rare case that is particularly useful to demonstrate a mechanism or a difficulty in diagnosis
- new diagnostic method
- new or modified treatment
- a text that demonstrates relevant findings and is well documented and without ambiguity.

**Overviews.** An overview does not contain unpublished data. It presents the point of view of the author(s) in a less rigorous form than in a regular review or minireview and is of interest to the general reader.

### **Cell Biology**

The main characteristic of research papers in the area of Cell Biology is the emphasis on the integration at the cellular level of biochemical, molecular, genetic, physiological, and pathological information. This section considers manuscripts dealing with either prokaryotic or eukaryotic biological systems at any developmental stage. Papers on all aspects of cellular structure and function are considered to be within the scope of Cell Biology by the BJMBR. The Editors encourage submission of manuscripts defining cell biology as an area of convergence of several other research fields, especially manuscripts providing insights into the cellular basis of immunology, neurobiology, microbial pathology, developmental biology, and disease. Manuscripts containing purely descriptive observations will not be published. Manuscripts reporting new techniques will be published only when adequately validated and judged by the Editors to represent a significant advance.

### **Biological activity of natural products**

The Journal will consider papers for publication which describe the activity of substances of biological origin only if they satisfy all of the following criteria:

- Papers should describe the separation of the crude material into fractions (not necessarily into homogeneous materials) with the fractions containing biological activity identified clearly in the separation scheme. Phytochemical studies should be accompanied by biological tests. A survey of pharmacological activity of plant extracts or teas will not be considered for publication.
- In addition to the demonstration of activity in one or more biological system, experiments must be performed attempting to provide information concerning the mechanism(s) of action of the substance(s) being tested.
- Sufficient experimental information must be provided to permit repetition of the preparation of fractions and the bioassay used.
- Sources should be identified completely, and, if plant material, a specimen should be classified by an expert and deposited in a local botanical garden, university or research institute. The name and institution of the person who classified the plant and the number of the voucher under which it was deposited should be provided in the Material and Methods section.

The Journal does not publish toxicological studies.

### **Authorship information**

Only those persons who contributed directly to the intellectual content of the paper should be listed as authors. Authors should meet all of the following criteria, thereby allowing persons named as authors to take public responsibility for the content of the paper.

- Conceived, planned and carried out the experiments that led to the paper or interpreted the data it presents, or both.
- Wrote the paper, or reviewed successive versions.

- Approved the final version.
- Holding positions of administrative leadership, contributing patients, and collecting and assembling data, however important to the research, are not by themselves criteria for authorship. Other persons who have made substantial, direct contributions to the work but cannot be considered authors should be cited in the acknowledgment section, with their permission, and a description of their specific contributions to the research should be given.

**Permission for Reproduction.** The journal is registered with the Copyright Clearance Center, Inc., 222 Rosewood Dr., Danvers, MA 01923, USA. Consent is given for the copying of articles for personal or internal use of specific clients. This consent is given on the condition that the copier pays directly to the Center the per copy fee beyond that permitted by US Copyright Law. This consent does not extend to other kinds of copyright, such as for general distribution, resale, advertising, and promotional purposes, or for the creation of new collective works.

All other inquiries regarding copyrighted material from this publication, other than those that can be handled through the Copyright Clearance Center, should be directed in writing to Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Fax: +55-16-3633-3825 or 3630-2778. E-mail: [bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br) or [bjournal@terra.com.br](mailto:bjournal@terra.com.br)

To request permission for reproduction, please send us a request via e-mail, fax or mail with the following information:

- Name, title, and institution
- Complete mailing address, phone number, fax number and e-mail
- Article title
- Year of publication, volume and issue number
- Authors' names
- Page numbers on which the material of interest appears
- Specific figure number or portion of text (or supply a photocopy)
- Include the following information about the intended use:
  - Title of book/journal in which Brazilian Journal material will appear
  - Author(s)/editor(s)
  - Publisher

### **Editorial review and processing**

For complete explanation of the Editorial review policies, please see Editorial policies.htm. The receipt of manuscripts is acknowledged immediately.

Once a paper has been evaluated by peer review, the authors will be notified of the editorial decision.

Galley proofs will be sent to authors for the correction of errors. Authors are responsible for all statements made in their article, including changes made by the copy editor and authorized by the corresponding author.

The dates of receipt and acceptance will be published for each article. Authors are expected to return manuscripts to the Journal within 15 calendar days after they are sent to them for modifications or for style and copy editing, and to return galley proofs after 72 hours. The total number of “late” days will be added to the submission date at the time of publication.

### **Manuscript preparation**

Manuscripts should be submitted in English. Authors are requested to use American spelling, except, of course, for references whose titles should appear exactly as published. Guidance on grammar, punctuation, and scientific writing can be found in the following sources: Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers. 7th edn. Rockefeller University Press, Reston, 2006; Medical Style and Format. Huth EJ (Editor). ISI Press, Philadelphia, 1987, Marketed by Williams & Wilkins, Baltimore, MD. The Brazilian Journal of Medical and Biological Research follows the reference format of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which can be found on the website of the National Library of Medicine ([http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)).

**Text Format** The text of a manuscript can only be accepted as a Microsoft Word file created with MS Word 6.5 or a later version as a "doc" or "rtf" document.

- Submit the manuscript by e-mail, in letter size format (8.5 x 11"), with wide margins of at least 1 inch (2.54 cm), 23 lines per page, which contains approximately 2,156 characters, including spaces.
- Use a serif font, preferably Times New Roman, 12 point type, including title page, abstract, text, acknowledgments, references, figure legends, and tables. Each page should contain the page number in the upper right-hand corner starting with the title page as page 1.
- Report all measurements in Système International, SI (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>) and standard units where applicable (see below).
- Do not use abbreviations in the title or abstract and limit their use in the text.
- The length of the manuscript and the number of tables and figures must be kept to a minimum.
- Ensure that all references are cited in the text.
- Generic names must be used for all drugs. Instruments may be referred to by proprietary name; the name and country or electronic address of the manufacturer should be given in parentheses in the text.

**Footnotes.** Text footnotes, if unavoidable, should be numbered consecutively in superscript in the manuscript and written on a separate page following the abstract.

### **Headings in text**

- Position all headings flush with the left margin.
- Keep headings short (three or four words).
- Use only three types of headings in the text. Clearly indicate the type of level of headings by using the following typographic conventions.
  - First-level: Only the 1<sup>st</sup> letter of the 1<sup>st</sup> word is capitalized, font size 11, **bold type**.



- Second-level: Only the 1<sup>st</sup> letter of the 1<sup>st</sup> word is capitalized, font size 9, **bold type**.
- Third-level: Only the 1<sup>st</sup> letter of the 1<sup>st</sup> word is capitalized, *italic type*.

### Abbreviations and symbols

- Explain all abbreviations in the text, figure and table legends when they first appear. Keep the number of abbreviations to a minimum.
- Do not explain abbreviations for units of measurement [3 mL, not 3 milliliters (mL)] or standard scientific symbols [Na, not sodium (Na)].
- Abbreviate long names of chemical substances and terms for therapeutic combinations. Abbreviate names of tests and procedures that are better known by their abbreviations than by the full name (VDRL test, SMA-12).
- Use abbreviations in figures and tables to save space, but they must be defined in the legend.

**Units.** The Système International (SI) (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>) in metric units is used for units and abbreviations of units. Examples:

- s for second
- min for minute
- h for hour
- L for liter
- m for meter
- kDa for mass in kilodaltons
- 5 mM rather than  $5 \times 10^{-3} \text{ M}$  or 0.005 M

### Title page.

The title page should contain the following information:

- The title should be as short and informative as possible, should not contain non-standard acronyms or abbreviations, and should not exceed two printed lines.
- Initials and last name(s) of author(s) (matched with superscript numbers identifying institutions).
- Institution(s) (Department, Faculty, University, city, state, country) of each author (in Portuguese if authors are from Brazil).
- Acknowledgment of research grants and fellowships (agency and grant number).
- Name, complete mailing address, including zip code, telephone number, fax number and e-mail of author to whom correspondence should be sent.

**Running Title.** This short title, to be used as a page heading, should not exceed 60 letters and spaces.

**Key words.** A list of key words or indexing terms (no more than 6) should be included. A capital letter should be used for the first letter of each key word, separated by a semicolon. The Journal recommends the use of medical subject headings of Index Medicus for key words to avoid the use of several synonyms as entry terms in the index for different papers on the same subject. Remember, key words are used by the SciELO Database (see <http://www.scielo.br/bjmbr;articlessearch/subject>) to index the article.

## Abstract

- Since abstracts are published separately by Information Services, they should contain sufficient hard data to be evaluated by the reader.
- The abstract should briefly and clearly present the problem, experimental approach, new results as quantitative data if possible, and conclusions.
- The abstract should not exceed 250 words and should be written as a single paragraph double-spaced on a separate page following the title page.
- Abbreviations should be kept to a minimum and must be defined at first citation.
- If the use of a reference is unavoidable, the full citation should be given within the abstract.
- Note that the Brazilian Journal publishes unstructured abstracts.
- Please see  
<[http://www.bjournal.com.br/Instructions/html/writing\\_a\\_good\\_abstract.htm](http://www.bjournal.com.br/Instructions/html/writing_a_good_abstract.htm)>  
for suggestions on writing a good abstract.

**Introduction.** This should state the purpose of the investigation, relationship to other work in the field, and justification for undertaking the research. An extensive listing or review of the literature is not recommended.

**Material and Methods.** Sufficient information should be provided in the text or by referring to papers in generally available journals to permit the work to be repeated and to determine the suitability of the methods used for the objectives of the research.

**Results.** The results should be presented clearly and concisely. Tables and figures should be used only when necessary for effective comprehension of the data. In some situations, it may be desirable to combine Results and Discussion in a single section.

**Discussion.** The purpose of the Discussion is to interpret the results and relate them to existing knowledge. Information given elsewhere in the text, especially in Results, may be cited but not repeated in detail in the Discussion.

**Acknowledgments.** When appropriate, briefly acknowledge technical assistance, advice and contributions from colleagues to the research. Financial support for the research and fellowships should be acknowledged on the title page.

## Tables

- Tables must be numbered consecutively with Arabic numerals in the text.
- Tables must have a descriptive title.
- All explanatory information should be given in a footnote below the table.
- All abbreviations must be defined in this footnote, even if they are explained in the text.
- Tables must be understandable without referring to the text.
- Each table should be typed double-spaced on a separate page after the Reference section in the submitted manuscript (or, if exceptionally large or requiring special symbols or unusual treatment, the table should be submitted as an image as a "tif" or "jpg" file).
- Vertical and diagonal lines should not be used in tables; instead, indentation and vertical or horizontal space should be used to group data.

- Adapting/Reproducing Tables and Relevant Permissions. Acknowledgments of original sources of copied material should be given as a reference in the table footnote.

## **Figures**

- All figures should have 300 dpi and be at least 5 inches (12.5 cm) wide.
- Figures must be numbered in the order in which they are cited in the text using consecutive Arabic numerals.
- Words in figures should have an initial capital letter followed by lower-case lettering; letter size and type should be uniform in style.
- Do not insert figures within the text.
- Figures will be accepted only in "tif", "jpg", "cdr" or "eps" format prepared preferentially with Adobe Photoshop or Corel Draw. In case a graph was created with Microsoft Word or Excel, it should be saved in the original file format.
- Do not copy/paste graphs or figures from one program to another. For information on the preparation of figures in "tif", "jpg" "cdr" and "eps" formats, see <http://cjs.cadmus.com/da/>.
- We cannot accept some application programs, such as Microsoft Office (Access), Corel Perfect Office (WordPerfect, Quattro Pro, Presentations), Lotus SmartSuite (Freelance Graphics, 1-2-3, Approach, WordPro), Harvard Graphics and SigmaPlot because they are not intended for the high resolution imaging. Graphs created in one of these programs and saved as "jpg" or similar also cannot be accepted.
- **Photomicrographs** should include stain and magnification data at the end of the legend for each part of the figure. A magnification bar should be added to each photomicrograph. If no scale marker appears in the figure, the original magnification should be reported in the legend.
- **Figure legends** should be typed double-spaced consecutively on a separate page.
- Figure legends must have a descriptive title and all explanatory information so that the figure is understandable without referring to the text.
- All abbreviations and symbols must be defined in the legend, even if they are explained in the text.
- **Adapting/reproducing figures and relevant permissions.** Acknowledgment of original sources of copied material should be given.
- **Color figures** should be in RGB, at least 300 dpi. There is no charge for color figures.
- Check figures carefully before submission to ensure that proper versions are being sent and that there are no labeling errors.

All figures with the exception of line drawings will be published exactly as the author sent them to the Journal and the reproduction quality will be the total responsibility of the author.

## **References**

Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct text citation. When possible, references in English should be cited. The reference list must be numbered consecutively in the order in which the references are first cited in the text, using arabic numerals, and must be typed double-spaced on separate sheets. In the text, citation of two or more references, within parentheses, should be separated by a comma without a space (1,5,7); three or more consecutive references should be separated by a hyphen (4-9).

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research follows the reference format of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which can be found on the website of the National Library of Medicine ([http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)). Use the Medline journal abbreviations and follow the reference style shown on the Website noted above, with several exceptions. See below for details. If the author uses the program "Reference Manager", copy the file containing the **style of the Brazilian Journal of Medical and Biological Research** and place it in the folder of "Styles". When submitting the manuscript, send the file produced in Reference Manager (".rmd") as an attachment.

The following information must be given in the list of references:

**Standard article.** Up to the first 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year, Volume, Complete Pages.

- Xu J, Liu M, Liu J, Caniggia I, Post M. Mechanical strain induces constitutive and regulated secretion of glycosaminoglycans and proteoglycans in fetal lung cells. *J Cell Sci* 1996; 109 (Pt 6): 1605-1613.
- Poirier P, Lemieux I, Mauriege P, Dewailly E, Blanchet C, Bergeron J, et al. Impact of waist circumference on the relationship between blood pressure and insulin: the Quebec Health Survey. *Hypertension* 2005; 45: 363-367.
- The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Australia* 1996; 164: 282-284.

**Abstract.** Up to the first 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year, Volume, Complete Pages (Abstract).

- Lima SM, Bonci DM, Grotzner SR, Ribeiro CA, Ventura DF. Loss of amacrine cells in MeHg-treated retinae in a tropical fish. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: E-5172 (Abstract).

**Article accepted for publication but not yet published.** Up to the first 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year of expected publication, (in press) at the end of the citation.

- Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CXC, et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005 (in press).

**"Unpublished results", "Personal communication" and "Submitted papers".** Reference should appear in the text with the individual name(s) and initials and not in the reference list.

- (Santos CS, da-Silva GB, Martins LT, unpublished results).
- It is assumed that the author has obtained written permission from the source when "personal communication" is cited.

**Book, whole.** Authors, Book title, Edition, City, Publisher, Year.

- Norman IJ, Redfern SJ. *Mental health care for elderly people*. New York: Churchill Livingstone; 1996.

**Book, chapter.** Authors, Chapter Title, Editors, Book title, Edition, City, Publisher, Year, Pages of citation.

- Kintzios SE. What do we know about cancer and its therapy? In: Kintzios SE, Barberaki MG (Editors), *Plants that fight cancer*. New York: CRC Press; 2004. p 1-14.
- Scheuer PJ, Lefkowitz JH. Drugs and toxins. In: Scheuer PJ, Lefkowitz JH (Editors), *Liver biopsy interpretation*. 6th edn. London: WB Saunders; 2000. p 134-150.

### Report

- WHO (World Health Organization), IPCS (International Program in Chemical Safety). *Environmental health criteria: 118 Inorganic mercury*. Geneva: World Health Organization; 1991.
- National Commission on Sleep Disorders Research. *Wake up America: a national sleep alert*. Washington: Government Printing Office; 1993.

### Thesis

- Joselevitch C. Visão no ultravioleta em *Carassius auratus* (Ostariophysi, Cypriformes, Cyprinidae): estudo eletrofisiológico do sistema cone - células horizontais. [Master's thesis]. São Paulo: Instituto de Psicologia, USP; 1999.

**Conference, Symposium Proceedings.** Cite papers only from published proceedings.

- Hejzlar RM, Diogo PA. The use of water quality modelling for optimising operation of a drinking water reservoir. *Proceedings of the International Conference Fluid Mechanics and Hydrology*. 1999 Jun 23-26; Prague. Prague: Institute of Hydrodynamics AS CR; 1999. p 475-482.

**Electronic citations** (Online Journals). Ensure that URLs are active and available.

- American Academy of Ophthalmology. Diabetic retinopathy disease severity scale. *Am Acad Ophthalmol* [http://www.aao.org/education/library/recommendations/international\\_dr.cfm](http://www.aao.org/education/library/recommendations/international_dr.cfm); 2005.
- Simon JA, Hudes ES. Relationships of ascorbic acid to blood lead levels. *JAMA* <http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/281/24/2289>; 1999.

**Internet communication.** Ensure that URLs are active and available. Provide DOI, if available.

- Developmental toxicology. <http://www.devtox.org/nomenclature/organ.php>. Accessed June 27, 2005.
- CAPES Statistics. <http://www.capes.gov.br/capes/portal>. Accessed March 16, 2006.
- CNPq Plataforma Lattes, "Investimentos do CNPq em CT&I". <http://fomentonacional.cnpq.br/dmfomento/home/index.jsp>. Accessed March 16, 2006.

## Audiovisual material

- *Physician's Desk Reference (PDR)*. Release 2003.1AX. [CD-ROM]. Montvale: Thomson PDR; 2003.

## Computer programs

- Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, et al. *Epi info, version 6.04: a word processing database and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers*. [Computer program]. Atlanta: Centers of Disease Control and Prevention; 1998.
- *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*. Version 12.0. [Computer program]. Chicago: SPSS Inc.; 2006.

## Patent

- Larsen CE, Trip R, Johnson CR. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. Patent No. 5.529.067. Novoste Corporation; 1995.

## Related Links

- Writing a Good Abstract ([http://www.bjournal.com.br/Instructions/html/writing\\_a\\_good\\_abstract.htm](http://www.bjournal.com.br/Instructions/html/writing_a_good_abstract.htm))
- Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication (<http://www.icmje.org/index.html>)
- The Système International (SI) (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>) in metric units is used for units and abbreviations of units.
- Instructions to Make Quality Images for Publications - <http://cjs.cadmus.com/da/>
- The Editorial Policies of the Brazilian Journal of Medical and Biological Research (<http://www.bjournal.com.br/Instructions/html/policies.htm>)
- Writing Papers for Scientific Journals (<http://www.bjournal.com.br/lectures.htm>)
- How Editors Evaluate Scientific Papers for Publication (<http://www.bjournal.com.br/lectures.htm>)
- Effect of SciELO Open Access on Brazilian Scientific Journals (<http://www.bjournal.com.br/lectures.htm>)
- Sense About Science (<http://www.senseaboutscience.org.uk/index.php/site/project/30/>)
- How to Read a Scientific Paper (<http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc568/papers.htm>)
- PLoS Biology Guidelines for Table and Figure Preparation ([http://journals.plos.org/plosbiology/figure\\_guidelines.php](http://journals.plos.org/plosbiology/figure_guidelines.php))

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)