

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA**

Juliana da Silveira Schauren

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**ANÁLISE DE UMA VARIANTE GÊNICA DO RECEPTOR DE
QUIMIOCINAS CCR5 EM PACIENTES DO RIO GRANDE DO SUL
COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Porto Alegre

2010

Juliana da Silveira Schauren

**ANÁLISE DE UMA VARIANTE GÊNICA DO RECEPTOR DE
QUIMIOCINAS CCR5 EM PACIENTES DO RIO GRANDE DO SUL
COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Orientador: José Artur Bogo Chies

Curso de Biomedicina

2010

Dedico este trabalho a quatro pessoas que foram fundamentais para minha formação pessoal: minha mãe, Marisa da Graça da Silveira; meu pai, Libório Schauen, minha avó, Edite da Silva Nunes da Silveira e minha madrinha, Maria Regina Marques Barbosa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família e aos meus amigos por estarem sempre me apoiando e por entenderem minha ausência em todos os momentos em que precisei me dedicar aos estudos.

Agradeço muito aos meus colegas e amigos do laboratório por colaborarem na execução deste trabalho, cada um com seu jeitinho especial. Sou muito feliz por ter colegas como vocês. Colegas que ensinam, ajudam, incentivam, criticam, brincam, discutem. Colegas que nos fazem sorrir nos momentos de desespero, que dão um ombro amigo para chorar, que corrigem nossas falhas, que nos irritam, que nos divertem, que pagam mico com a gente, enfim, colegas muito especiais que tornam nosso ambiente de trabalho muito agradável. Vocês são uma grande família para mim. Obrigada imunopovo!

Agradeço ao meu colega Tiago Degani Veit por ajudar com as análises estatísticas e por ter colaborado muito na etapa final do trabalho.

Agradeço especialmente ao meu orientador, José Artur Bogo Chies, primeiro, por ter me aceitado como estagiária. Segundo, por ter me ensinado muito e por me fazer gostar ainda mais da imunogenética. Terceiro, por ter aceitado ser meu orientador no trabalho de conclusão de curso, mesmo em um período agitado de compromissos profissionais. Obrigada Zéca!

ÍNDICE GERAL

1. Resumo	1
2. Introdução	2
2.1. Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	2
2.2. O Receptor de Quiniocinas CCR5	6
3. Artigo Científico	9
4. Tabelas do Artigo Científico	18
5. Conclusões e Perspectivas	21
6. Referências	22
7. Anexos	25
7.1. Normas para Apresentação Ora e Escrita.....	25
7.2. Normas da Revista <i>Journal of Autoimmunity</i>	27

RESUMO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune que tem como características a inflamação em diversos órgãos e a formação de imunocomplexos. O CCR5 é um importante receptor de quimiocinas no processo inflamatório, e sua variante alélica mais conhecida, o CCR5 Δ 32, gera uma proteína truncada que não chega à superfície celular alterando a resposta destas células durante a inflamação. O objetivo deste estudo foi analisar a frequência alélica e genotípica do CCR5 Δ 32 em pacientes com LES do Rio Grande do Sul e verificar uma possível associação destas frequências com características clínicas e sintomatologia dos pacientes em questão. Para isto, foram analisados 354 pacientes com LES e 360 controles. Nossos dados não indicaram associação desta variante com a suscetibilidade ao LES, entretanto, uma importante associação entre o alelo e o desenvolvimento de nefrite lúpica foi observada em pacientes afro-descendentes. Além disso, observamos que a maioria dos pacientes que possuíam o CCR5 Δ 32 e apresentavam nefrite estavam classificados na classe mais severa, a classe IV. Afro-descendentes portadores do alelo variante apresentaram 36,57 vezes mais chance de desenvolver nefrite classe IV em comparação com afro-descendentes sem o alelo. A análise multivariada controlando para presença de anticorpos anti-DNA, hipertensão e idade no diagnóstico resultou em um risco relativo 4,05 vezes maior de um paciente com o alelo CCR5 Δ 32 desenvolver nefrite classe IV. Nossos dados indicam que o alelo CCR5 Δ 32 é um importante modificador no LES podendo ser considerado um fator de suscetibilidade à nefrite lúpica, e que em afro-descendentes, talvez devido a uma maior susceptibilidade genética já existente, este fator é mais evidente.

Palavras-chave: CCR5, CCR5 Δ 32, LES, lúpus, nefrite, autoimunidade.

INTRODUÇÃO

Lúpus Eritematoso Sistêmico

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune caracterizada pela síntese excessiva de autoanticorpos, pela formação de imunocomplexos (hipersensibilidade do tipo III) e pelo dano tecidual. Essa doença possui etiopatogênese complexa, apresentação heterogênea e curso imprevisível, tendo períodos variáveis de atividade e remissão. O lúpus ocorre principalmente em mulheres com uma razão de 9:1 entre mulheres e homens respectivamente [1] e seus sintomas aparecem geralmente entre 20 e 30 anos, mas pode se manifestar em qualquer idade. As manifestações do LES diferem entre pacientes, regiões geográficas e etnias, apresentado maior prevalência, incidência e severidade em afrodescendentes do que em euro-descendentes [2].

Etiologia e patogênese: A causa do LES permanece desconhecida, entretanto a presença de uma grande concentração de anticorpos contra antígenos próprios (principalmente anticorpos anti-nucleares - ANAs) nestes pacientes indica que o principal problema no LES é um defeito nos mecanismos que mantêm a auto-tolerância. Foram identificados anticorpos contra uma gama de componentes nucleares e citoplasmáticos de diferentes células, contra antígenos de superfície das células do sangue e contra proteínas complexadas com fosfolipídios. A tabela 1 lista diversos tipos de ANAs e suas associações com o LES. Anticorpos contra DNA de fita dupla (dsDNA) e os antígenos Smith (Sm) são característicos de LES. É importante ressaltar que indivíduos saudáveis também podem ter autoanticorpos circulantes, entretanto a titulação é muito mais baixa e aumenta com a idade [1].

Muitas evidências indicam uma predisposição genética para o LES. Estudos com familiares de pacientes com LES indicaram que eles possuem risco mais elevado de desenvolver LES e estudos com gêmeos demonstram uma maior frequência de concordância (>20%) entre gêmeos monozigóticos quando comparados com gêmeos dizigóticos (1 a 3%) [1]. Foi observado que gêmeos monozigóticos que não coincidiam quanto ao LES possuíam padrões e títulos semelhantes de autoanticorpos, evidenciando que a expressão da doença é também influenciada por fatores não-genéticos, possivelmente ambientais como, por exemplo, drogas (que podem induzir

uma resposta semelhante ao lúpus em humanos), a exposição à luz ultravioleta (que exacerba a doença em muitos indivíduos) e os hormônios sexuais (que parecem influenciar na ocorrência e manifestação da doença). Estudos de associação com HLA (Antígeno Leucocitário Humano, do inglês *Human Leukocyte Antigen*) apóiam fortemente a idéia de que genes no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) regulam a produção de autoanticorpos específicos, em vez de conferir uma predisposição generalizada ao LES. Alguns pacientes possuem deficiências herdadas de componentes do complemento, prejudicando a remoção de imunocomplexos pelo sistema fagocítico mononuclear, favorecendo assim sua deposição tecidual. Além dos genes do MHC e do sistema complemento, diversos outros genes de suscetibilidade foram identificados [1].

Tabela 1: Anticorpos Anti-nucleares no LES. (Modificada de [1])

Natureza do Antígeno	Sistema do Anticorpo	LES, % Positiva
Muitos antígenos nucleares (DNA, RNA, proteínas)	ANA genéricos (imunofluorescência indireta)	>95
DNA nativo	Anti-DNA de dupla fita	40-60*
Histonas	Anti-histonas	50-70
Proteínas nucleares de pequenas partículas de ribonucleoproteínas nucleares (antígenos Smith)	Anti-Sm	20-30*
Ribonucleoproteínas (RNP U1)	RNP nuclear	30-40
RNP	SS-A (Ro)	30-50
RNP	SS-B (La)	10-15
DNA topoisomerase I	Scl-70	<5
Proteínas centroméricas	Anticentrômero	<5
Histidil-t-RNA sintetase	Jo-1	<5

*Valores com asterisco indicam alta correlação.

LES, lúpus eritematoso sistêmico; ANA, anticorpos nucleares; RNP, Ribonucleoproteína.

Disfunções no sistema imune também estão envolvidas na patogênese do LES. A ativação policlonal de células B e, mais importante, a ativação de células B dependente de células T auxiliares antígeno-específicas levam à produção de autoanticorpos patogênicos. Outros fatores que contribuem para o desenvolvimento do lúpus são a eliminação defeituosa de células apoptóticas, a desregulação de citocinas (principalmente interferons) e depósitos de imunocomplexos.

Morfologia: as alterações morfológicas no LES são extremamente variáveis e as manifestações clínicas possuem um curso imprevisível, tornando seu diagnóstico complexo inclusive para os mais experientes reumatologistas. Para facilitar seu diagnóstico, o “*American College of Rheumatology*” publicou o “*The 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus*” modificado em 1997 [3] que lista as 11 alterações mais comuns para facilitar o diagnóstico desta patologia tão complexa, sendo necessária a presença de, no mínimo, quatro destas para ser classificada como LES [4]. Estes critérios podem ser observados na tabela 2.

As lesões mais características no LES são causadas pela deposição de imunocomplexos e podem atingir órgãos ou sistemas, sendo os mais frequentemente afetados o sistema vascular, as articulações, a pele, os rins, o sistema nervoso central e as cavidades serosas. Os sintomas variam de pessoa para pessoa, sendo listados a seguir os mais comuns: fadiga, dores de cabeça, dor ou inchaço nas articulações, febre, anemia e trombocitopenia, edema (principalmente nas pernas, nos pés e nas mãos), dor torácica pleurítica, eritema em forma de borboleta no rosto, fotossensibilidade, perda de cabelo, coagulação anormal, dedos brancos ou azuis no frio (fenômeno de Raynaud) e ulcerações bucais ou nasais [*Lupus Foundation of America*].

Os tratamentos mais utilizados são o uso de corticosteróides, imunossupressores ou antimaláricos. A interferência destas drogas no sistema imune aumenta a propensão a infecções nos pacientes. O LES ainda não tem cura e as causas mais comuns de óbito no LES são por falência renal e infecções. Apesar disso, a expectativa de vida após cinco anos de diagnóstico tem aumentado.

Além do lúpus eritematoso sistêmico, existem o lúpus eritematoso discóide e o lúpus eritematoso cutâneo subagudo, que afetam principalmente a pele, e o lúpus eritematoso induzido por drogas, que é semelhante ao LES, porém não costuma gerar comprometimento real e do sistema nervoso central.

Tabela 2: Critérios Revisados de 1982 e modificados em 1997 para a Classificação do LES. (Modificada de [1])

Critérios	Definição
1. Eritema malar	Eritema fixo, achatado ou elevado sobre a região malar.
2. Eritema discóide	Placas eritematosas em relevo com descamação ceratótica aderente e rolhas córneas foliculares; cicatrizes atróficas podem ocorrer.
3. Fotossensibilidade	Erupção cutânea resultante da exposição a raios UV
4. Úlceras orais	Ulceração oral ou nasofaríngea, geralmente sem dor, verificada por médicos
5. Artrite	Artrite não-erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por sensibilidade, inchaço ou derrame.
6. Pleurite	<ul style="list-style-type: none"> a) Pleurite – hitórico convincente de dor pleurítica ou atrito escutado por médico, ou evidências de derrame pleural; ou b) Pericardite – documentada por eletrocardiograma ou atrito, ou por evidência de derrame pericárdico.
7. Doença renal	<ul style="list-style-type: none"> a) Proteinúria persistente >0,5g/dl ou >3+ se quantificação não for realizada; ou b) Cilindros celulares – podem ser célula vermelha do sangue, hemoglobina, granular, tubular ou mista.
8. Doença neurológica	<ul style="list-style-type: none"> a) Colvulsões – na ausência de drogas agressoras ou disfunções conhecidas do metabolismo, p. ex., uremia, cetoacidose, desequilíbrio eletrolítico; ou b) Psicose – na ausência de drogas agressoras ou disfunções conhecidas do metabolismo, p. ex., uremia, cetoacidose, desequilíbrio eletrolítico.
9. Doença hematológica	<ul style="list-style-type: none"> a) Anemia hemolítica – com reticulocitose; ou b) Leucopenia - <4,0 x 10⁹/L (4.000/μl) total em duas ou mais ocasiões; ou c) Linfopenia - <1,5 x 10⁹/L (1.500/μl) em duas ou mais ocasiões; ou d) Trombocitopenia - <100 x 10⁹/L (100 x 10³/μl) na ausência de drogas agressoras.
10. Doença imunológica	Anti-ds DNA, anti-Sm e/ou antifosfolipídio.
11. Anticorpo nuclear anti-	Titulações anormais de anticorpos anti-nucleares por imunofluorescência ou ensaio equivalente, a qualquer momento e na ausência de drogas conhecidas de associação com a síndrome de lúpus induzido por drogas.

Anti-dsDNA: anticorpo contra DNA dupla fita.

O receptor de quimicinas CCR5

As quimiocinas são importantes mediadores da inflamação que atuam através da ligação a receptores específicos. No presente trabalho, será analisado um polimorfismo no gene de um receptor de quimiocinas, o CCR5, que parece estar envolvido na patogênese de doenças autoimunes.

O CCR5 é um importante receptor de quimiocinas pró-inflamatórias. Pertence à superfamília de receptores que possuem sete domínios transmembrana e é acoplado à proteína G. O gene codificador da molécula CCR5, em humanos, está localizado no cromossomo 3p21.3-p24. O CCR5 possui afinidade pelos ligantes CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES) e CCL8 (MCP-2) e é expresso principalmente na superfície de células que participam do processo inflamatório, como linfócitos Th1 ativados e de memória, monócitos, macrófagos e células dendríticas [5].

Esta molécula atua como um co-receptor para o vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1)[6, 7] e sua variante polimórfica mais conhecida, o CCR5 Δ 32, confere relativa resistência à infecção pelo HIV-1[8]. A homozigose para o alelo variante CCR5 Δ 32 confere uma resistência quase completa ao vírus, enquanto a heterozigose confere resistência parcial com progressão mais lenta da doença.

A variante polimórfica CCR5 Δ 32 contém uma deleção de 32 pares de bases, gerando uma proteína truncada que não chega à superfície celular. Este alelo apresenta uma distribuição curiosa na população: está ausente em populações nativas das Américas e Oceania, quase completamente ausente em populações nativas da África e da Ásia e apresenta um gradiente norte-sul na população caucasóide da Europa [9]. A frequência aproximada do alelo na Europa é 10% e a frequência média fora da Europa, 5% [10]. O CCR5 Δ 32 possivelmente surgiu no norte da Europa e a presença esporádica do alelo mutante em outras populações provavelmente ocorreu devido ao fluxo gênico de caucasóides europeus para as populações nativas de outras regiões [10]. Apesar da relativa resistência que essa variante confere à infecção pelo HIV-1, este vírus afeta os humanos há relativamente pouco tempo para influenciar na distribuição do alelo [10]. Apesar disso, é claro que o alelo CCR5 Δ 32 encontra-se sob um processo de seleção intensa em populações com alta prevalência do HIV-1 [11]. Muitas teorias foram propostas para explicar a distribuição do CCR5 Δ 32 nas

populações humanas. As primeiras evidências sugeriam que esta mutação havia sido selecionada por conferir resistência à peste bubônica [12], enquanto evidências mais recentes sugerem que a varíola teve uma maior pressão de seleção [11, 13]. Considera-se que outras infecções também tenham atuado nesta seleção, tornando mais provável que um somatório dos efeitos dessas infecções na população europeia tenha influenciado a distribuição do polimorfismo [13, 14]. Apesar da maioria dos estudos apontar para um aumento na frequência da variante CCR5 Δ 32, mediado por seleção, em populações humanas, já foi também sugerido que a frequência desta variante seria relativamente alta no passado, e que diferentes tipos de infecções tenham diminuído a frequência desse polimorfismo, gerando a distribuição atual [13].

Assim como não ter a proteína funcional pode ser um fator de proteção contra a infecção pelo HIV-1, essa deleção pode atuar como um fator de risco para outras doenças como a infecção causada pelo vírus do Oeste do Nilo [15]. É de se esperar que a falta de uma molécula tão importante para o sistema imune como o CCR5 tenha um efeito negativo em algumas ou até muitas situações. Esse efeito negativo já foi relatado por diversos autores no contexto de doenças inflamatórias ou infecciosas e até no desenvolvimento de câncer [9]. Foram encontradas relações entre o CCR5 Δ 32 e a morte precoce em pacientes com esclerose múltipla [16], alta frequência do alelo em pacientes com anemia falciforme [17], curso clínico severo também em pacientes com anemia falciforme [18], forma mais grave da doença em pacientes com Crohn [19], severidade da doença em artrite idiopática juvenil [20], severidade da doença em artrite induzida em camundongos, no caso de animais CCR5 nocaute [5], severidade da doença em artrite reumatóide (AR) [21], aumento do risco de desenvolver LES [22], contribuição no desenvolvimento de anticorpos anti-dsDNA e de nefrite em pacientes com LES [23]. No contexto de doenças autoimunes, é importante considerar que alguns autores sugerem um papel protetor no desenvolvimento de AR [24] e menor severidade da doença [20, 25]. Aparentemente, o alelo em estudo tem um papel protetor em AR contrastando com um aumento no risco de desenvolver LES [26]. A explicação dos autores para este contraste reside na diferença entre o padrão de resposta das células T auxiliares nas duas doenças, sendo predominantemente Th1 em AR e Th2 em LES [27].

Tendo em vista a grande quantidade de estudos que têm sido desenvolvidos a respeito do polimorfismo CCR5 Δ 32, principalmente em relação a doenças inflamatórias e autoimunes e a constante procura de terapias que visam inibir o alelo funcional CCR5, torna-se importante elucidar o papel dessa molécula no contexto destas doenças. Considerando-se a necessidade de mais trabalhos na área para melhor compreender o papel desta molécula nas doenças, o objetivo deste trabalho é analisar a frequência alélica e genotípica da variante gênica CCR5 Δ 32 em pacientes com LES do Rio Grande do Sul (RS) comparando com as frequências das mesmas variantes em indivíduos saudáveis da mesma região e verificar possível associação das mesmas com características clínicas e sintomatologia dos pacientes em questão.

ANÁLISE DE UMA VARIANTE GÊNICA DO RECEPTOR DE QUIMIOCINAS CCR5 EM PACIENTES DO RIO GRANDE DO SUL COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Juliana da Silveira Schauren^a, Tiago Degani Veit^a, João Adalberto Marasca^b, Ricardo Machado Xavier^b, João Carlos Tavares Brenol^b, Odirlei André Monticielo^b, José Artur Bogo Chies^{a*}

^a *Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Laboratório de Imunogenética, Porto Alegre/RS, Brasil.*

^b *Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Reumatologia. Porto Alegre/RS, Brasil.*

RESUMO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune que tem como características a inflamação em diversos órgãos e a formação de imunocomplexos. O CCR5 é um importante receptor de quimiocinas no processo inflamatório, e sua variante alélica mais conhecida, o CCR5 Δ 32, gera uma proteína truncada que não chega à superfície celular alterando a resposta destas células durante a inflamação. O objetivo deste estudo foi analisar a frequência alélica e genotípica do CCR5 Δ 32 em pacientes com LES do Rio Grande do Sul e verificar uma possível associação destas frequências com características clínicas e sintomatologia dos pacientes em questão. Para isto, foram analisados 354 pacientes com LES e 360 controles. Nossos dados não indicaram associação desta variante com a suscetibilidade ao LES, entretanto, uma importante associação entre o alelo e o desenvolvimento de nefrite lúpica foi observada em pacientes afro-descendentes. Além disso, observamos que a maioria dos pacientes que possuíam o CCR5 Δ 32 e apresentavam nefrite estavam classificados na classe mais severa, a classe IV. Afro-descendentes portadores do alelo variante apresentaram 36,57 vezes mais chance de desenvolver nefrite classe IV em comparação com afro-descendentes sem o alelo. A análise multivariada controlando para presença de anticorpos anti-DNA, hipertensão e idade no diagnóstico resultou em um risco relativo 4,05 vezes maior de um paciente com o alelo CCR5 Δ 32 desenvolver nefrite classe IV. Nossos dados indicam que o alelo CCR5 Δ 32 é um importante modificador no LES podendo ser considerado um fator de suscetibilidade à nefrite lúpica, e que em afro-descendentes, talvez devido a uma maior susceptibilidade genética já existente, este fator é mais evidente.

Palavras-chave: CCR5, CCR5 Δ 32, LES, lúpus, autoimunidade.

*Autor correspondente: José Artur Bogo Chies. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Genética, Laboratório de Imunogenética. Av. Bento Gonçalves 9500 - Prédio 43323 - Lab. 212

Agronomia - Porto Alegre, RS - Brasil

CEP 91501-970

CP 15053

Tel.: 55-51-33086737

Fax: 55-51-33087311

E-mail: jabchies@terra.com.br

1. Introdução

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune caracterizada pela síntese excessiva de autoanticorpos, pela formação de imunocomplexos (hipersensibilidade do tipo III) e pelo dano tecidual. O lúpus ocorre principalmente em mulheres, com uma razão de 9:1 [1] e seus sintomas aparecem geralmente entre 20 e 30 anos, mas a doença pode manifestar-se em qualquer idade. As manifestações do LES diferem entre pacientes, dependendo da região geográfica dos mesmos e da etnia, apresentado maior prevalência, incidência e severidade em afro-descendentes do que em euro-descendentes [2]. O LES possui etiopatogênese complexa, apresentação heterogênea e curso imprevisível, tendo períodos variáveis de atividade e remissão. Seu diagnóstico é complexo inclusive para os mais experientes reumatologistas. O “*American College of Rheumatology*” publicou o “*The 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus*” modificado em 1997 [3] que lista 11 critérios para facilitar o diagnóstico desta patologia tão complexa, sendo necessária a presença de, no mínimo, quatro destes para ser classificada como LES [4]. Os principais sintomas são eritema malar, eritema discóide, fotosensibilidade, úlceras orais, artrite, serosite, distúrbios renais, distúrbios neurológicos, distúrbios hematológicos, distúrbios imunológicos e presença de anticorpo anti-nuclear.

As principais alterações teciduais presentes nos pacientes são causadas por inflamação. Quimiocinas são importantes mediadores da inflamação que atuam através da ligação a receptores específicos. Um receptor de quimiocinas que vem sendo muito estudado é o CCR5. Ele pertence à superfamília de receptores que possuem sete domínios transmembrana e é acoplado à proteína G. Seu gene está localizado no cromossomo 3p21.3-p24. O CCR5 possui afinidade pelos ligantes CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES) e CCL8 (MCP-2) e é expresso principalmente na superfície de células que participam do processo inflamatório, como linfócitos Th1 ativados e de memória, monócitos, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos [5]. Muitos estudos já abordaram a molécula CCR5 desde que a mesma foi descrita como um co-receptor para o vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1)[6, 7] e sua variante polimórfica mais conhecida, o CCR5 Δ 32, confere relativa resistência à infecção pelo HIV-1[8].

A variante polimórfica CCR5 Δ 32 contém uma deleção de 32 pares de bases, gerando uma proteína truncada que não chega à superfície celular. Este alelo apresenta uma distribuição curiosa na população: está ausente em populações nativas das Américas e Oceania, quase completamente ausente em populações nativas da África e da Ásia e apresenta um gradiente norte-sul na população caucasóide da Europa [9]. A frequência aproximada do alelo na Europa é 10% e fora da Europa 5% [10].

Assim como não ter a proteína funcional pode ser um fator de proteção contra a infecção pelo HIV-1, essa deleção pode atuar como um fator de risco para outras doenças como a infecção causada pelo vírus do Oeste do Nilo [11]. É de se esperar que a falta uma molécula tão importante para o sistema imune como o CCR5 tenha um efeito negativo em algumas ou até muitas situações. Esse efeito negativo já foi relatado por diversos autores no contexto de doenças inflamatórias ou infecciosas e até no desenvolvimento de câncer [9]. Alguns exemplos de doenças onde este efeito foi encontrado são esclerose múltipla [12], anemia falciforme [13, 14], doença de Crohn [15], artrite idiopática juvenil [16], artrite induzida em camundongos, no

caso de animais CCR5 nocaute [5] e artrite reumatóide [17]. Em LES, Aguilar e colaboradores sugeriram a existência de uma leve aumento na produção de anticorpos contra DNA dupla fita (anti-dsDNA), no desenvolvimento de nefrite e no desfecho mais severo em pacientes com LES da Espanha que possuíam o alelo CCR5 Δ 32 [18]. Em outro trabalho, Mamtani e colaboradores obtiveram resultados que indicam um aumento no risco de desenvolver LES, altos títulos de autoanticorpos e no risco para desenvolver nefrite em pacientes dos Estados Unidos e da Colômbia que portavam o alelo CCR5 Δ 32 [19].

Tendo em vista a grande quantidade de estudos que têm sido desenvolvidos a respeito do polimorfismo CCR5 Δ 32, principalmente em relação a doenças inflamatórias e autoimunes, e a constante busca de terapias que visam inibir o alelo funcional CCR5, torna-se importante elucidar o papel dessa molécula no contexto destas doenças. O objetivo deste trabalho é analisar a frequência alélica e genotípica da variante gênica CCR5 Δ 32 em pacientes com LES do Rio Grande do Sul (RS) comparando com indivíduos saudáveis e verificar possível associação das mesmas com características clínicas e sintomatologia dos pacientes em questão.

2. Resultados

2.1. *Dados dos pacientes*

Foram incluídos no estudo 354 pacientes com LES (328 mulheres e 26 homens). A idade média dos pacientes foi $45,5 \pm 14,7$ anos, a idade média no diagnóstico foi de $32,5 \pm 13,9$ anos e o tempo médio de doença foi $13 \pm 8,5$ anos. A média do SLEDAI (índice de atividade da doença, do inglês *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) acessado quando da primeira avaliação [20] foi de $3,05 \pm 4,72$ e do SLICC (índice de dano da doença, do inglês *Systemic Lupus International Collaborating Clinics*) [21] foi $1,11 \pm 1,39$. As demais características clínicas estão apresentadas na tabela 1.

2.2. *CCR5 Δ 32 entre pacientes e controles*

Devido à já conhecida discrepância na distribuição do alelo CCR5 Δ 32 entre populações europeias e africanas, decidiu-se fazer a comparação das frequências genotípicas e alélicas estratificando por origem étnica. Tanto as amostras de pacientes quanto de controles apresentavam frequências que não desviavam do esperado para equilíbrio de Hardy-Weinberg (dados não apresentados). Na análise entre pacientes e controles, não foi encontrada diferença significativa entre as frequências alélicas e genotípicas do CCR5 Δ 32 (tabela 2). Em afro-descendentes, foi observada uma frequência maior deste alelo em pacientes (4,22%) em relação aos controles (1,50%), porém essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,064$).

2.3. *Dados dos pacientes estratificando por etnia*

Foi realizada uma análise estratificada por etnia entre pacientes e características clínicas. Conforme já descrito em Monticielo e colaboradores [22] que avaliaram esta mesma coorte de pacientes para outras variantes gênicas, afro-descendentes apresentaram fotossensibilidade em maior frequência do que euro-descendentes (38,6 contra 19,9; $p = 0,001$). Também foi encontrada uma frequência maior em afro-descendentes de dois autoanticorpos, o anti-Ro (65,2 contra 38,3; $p < 0,001$) e o anti-La (22,5 contra 10,9; $p = 0,014$). Em euro-descendentes, foi encontrada uma maior frequência de leucopenia/linfopenia (41,7 contra 25,3; $p = 0,007$).

2.4. *Ccr5Δ32 entre pacientes*

Comparando pacientes portadores do CCR5Δ32 com os não portadores, foi observado que a idade no diagnóstico foi menor nos portadores, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa. Também foi visto que a frequência do alelo mutado foi maior em mulheres que apresentavam leucopenia/linfopenia (6,86% contra 1,6%; $p = 0,035$; OR 4,53; 95% IC 1,01-41,63). Não foi encontrada associação entre o alelo em estudo e os índices de dano e atividade da doença (SLICC e SLEDAI respectivamente), nem entre as outras características clínicas (dados não mostrados).

2.5 *Nefrite*

Os dados referentes à nefrite estão apresentados na tabela 3. Foi observada uma predisposição à nefrite em afro-descendentes que possuíam o alelo CCR5Δ32 ($p_{\text{Fisher}} = 0,011$, $p_{\text{corr}} = 0,044$). Dividindo-se os pacientes pelas diferentes classes de nefrite, observou-se que a frequência do alelo não se distribuía uniformemente entre as classes ($p_{\text{Fisher}} = 0,004$; $p_{\text{corr}} = 0,016$). Pode ser observado que a maioria dos pacientes, independentemente de etnia, que portavam o alelo CCR532 e que apresentavam nefrite foi classificada na classe IV, de maior severidade de acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde). Oitenta por cento dos afro-descendentes portadores do polimorfismo apresentavam nefrite classe IV. Além disso, todos os pacientes euro-descendentes portadores do alelo CCR5Δ32 que apresentavam nefrite confirmada por biópsia também apresentavam classe IV. Comparando pacientes com nefrite classe IV com todos os outros pacientes (com outra classe de nefrite e sem nefrite) (tabela 4), foi observado que pacientes afro-descendentes portadores do alelo CCR5Δ32 apresentaram quase 36,57 vezes mais chance de ter nefrite classe IV (Tabela 4). Interessantemente, nosso único paciente homozigoto para o CCR5Δ32 era mulher, afro-descendente e com nefrite classe IV.

Estudos prévios observaram que altos níveis de anti-dsDNA [23, 24], hipertensão arterial sistólica [25] e idade precoce [24] são fatores que predispoem a formas graves de nefrite. Com base nisto, foram conduzidas análises multivariadas para averiguar a influência do alelo CCR5Δ32 na predisposição à nefrite classe IV controlando pela presença/ausência de anticorpos anti-dsDNA, hipertensão e idade no diagnóstico. Sexo, origem étnica, tempo de doença e interação entre presença do alelo e raça foram também incluídos no primeiro *round* de análise mas não adicionaram significância ao modelo (dados não mostrados). O modelo final resultou em um aumento no risco relativo de 4,05 vezes para portadores do alelo CCR5Δ32 de desenvolver nefrite classe IV em relação a pacientes não portadores (Tabela 5).

3. **Discussão**

Nesse estudo analisou-se a influência da variante CCR5Δ32 na patologia do LES. Este é o primeiro estudo a analisar essa variante genética no LES em uma população brasileira e apenas dois outros estudos (um entre espanhóis [18] e um entre norte-americanos e colombianos [19]) estão disponíveis na literatura.

Nossos achados mais importantes estão relacionados à nefrite lúpica. O comprometimento renal é muito comum no LES e existem vários tipos de nefrite, que podem ser clinicamente diferenciadas por biópsia. A classificação da nefrite lúpica é feita de acordo com a proposta da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 1982, revisada em 2003 [26]. De acordo com a última publicação, a nefrite pode ser classificada em classe I (nefrite mesangial mínima), II (nefrite proliferativa

mesangial), III (nefrite focal), IV (nefrite difusa), V (nefrite membranosa) e VI (nefrite esclerosante avançada), sendo a classe I a mais branda (sem recomendação para biópsia) e a classe IV a mais grave. Stasikowska e colaboradores detectaram células CCR5⁺ em amostras de tecido renal de pacientes com nefrite classe IV lúpicas em contraste com a falta destas células em controles saudáveis [27]. Estes pesquisadores também relataram um aumento na concentração da quimiocina CCL5 (ligante dos CCR1, 3 e 5) nestas amostras e sugerem que a quimiocina CCL5 está envolvida na patogênese do dano renal na nefrite lúpica [27]. Sabe-se que a atração das células do sistema imune para tecidos lesados decorre da liberação de diversas quimiocinas por estes tecidos e que estas quimiocinas são “promíscuas”, ou seja, uma quimiocina pode se ligar a mais de um tipo de receptor [28, 29]. Isso é importante para observarmos que o aumento do CCL5 em tecidos lesados atrai tanto células CCR5⁺ quanto células CCR1⁺ e CCR3⁺ [29].

Os resultados encontrados em nosso estudo indicam que, em pacientes com LES, o alelo CCR5Δ32 confere uma predisposição à nefrite classe IV. Podemos sugerir que, em pacientes portadores de CCR5Δ32, subpopulações distintas de células respondam ao sinal das quimiocinas disponíveis devido à ausência ou menor expressão do CCR5. Nossos dados corroboram os achados de Aguilar e colaboradores [18] quanto ao envolvimento do CCR5Δ32 em LES. Ambos os estudos indicam que o CCR5Δ32 não parece ser um fator de susceptibilidade ao LES, mas que este alelo parece estar envolvido no desenvolvimento de nefrite. Apesar dos dados referentes à nefrite encontrados por Aguilar e colaboradores não serem estatisticamente significativos após correção, nosso estudo confirma esta tendência mostrando dados significativos em uma população com tamanho amostral maior.

Nossos resultados sugerem que o alelo CCR5Δ32 é um importante modificador no LES. Quando estratificamos os dados por etnia, o polimorfismo parece ser um modificador ainda mais determinante em afro-descendentes. É importante salientar que esta variante gênica não está presente originalmente na população africana [10] e que sua presença em afro-descendentes é resultado de miscigenação. Mulheres negras apresentam uma maior frequência de lúpus, portanto pode-se dizer que existe uma maior predisposição genética para o LES em afro-descendentes quando comparados a indivíduos de outras etnias. Quando o alelo CCR5Δ32 está presente neste contexto de predisposição, adicionando mais um fator de predisposição, sua contribuição parece ficar em maior evidência.

Burling e colaboradores indicam que pacientes com LES que possuem altos níveis de anticorpos anti-dsDNA são mais propensos a desenvolver nefrite classe IV [23]. Nos nossos pacientes, a positividade para anticorpos anti-dsDNA não foi um fator significativamente determinante para a ocorrência de nefrite classe IV. No entanto, é importante ressaltar que não foi feita a dosagem dos níveis de anti-dsDNA nestes pacientes, o que pode ter ocasionado uma perda de sensibilidade na análise desse fator. Não obstante, a ocorrência de hipertensão e idade precoce mostraram-se fatores relevantes ao modelo. Controlando por essas variáveis, salientou-se mais ainda a relevância da presença do alelo CCR5Δ32 para a ocorrência de nefrite do tipo IV em pacientes com lúpus.

Uma possível hipótese para o envolvimento do CCR5Δ32 na nefrite lúpica seria que a falta do CCR5 na superfície das células do sistema imune prejudicaria os mecanismos de resolução da inflamação. Doodes e colaboradores [5] sugerem mecanismos pelos quais a falta do CCR5 levaria a um aumento da inflamação. Uma sugestão seria que um déficit deste receptor em células T regulatórias (T_{reg})

prejudicaria sua migração para tecidos inflamados, dificultando a resolução da inflamação. Outro mecanismo que poderia atuar na resolução da inflamação, e que pode ser prejudicado pela falta do CCR5, seria a ligação das quimiocinas locais a receptores CCR5 com atividade *decoy* (“chamariz”) presentes em células T apoptóticas e neutrófilos, funcionando como um “tampão” imunológico, reduzindo a concentração de quimiocinas no local e auxiliando na resolução da inflamação [30].

Terapias que visam inibir o CCR5 estão sendo desenvolvidas e testadas com o objetivo principal de tratar indivíduos infectados pelo HIV, contudo, ainda existem lacunas no entendimento do papel desta molécula na resposta imune, o que gera uma preocupação quanto à segurança destas terapias [31]. Nossos resultados são mais uma evidência de que a ausência ou menor expressão da molécula CCR5 funcional pode provocar consequências negativas na resposta imunológica, ressaltando a necessidade de mais estudos que determinem as diferentes funções desta molécula em respostas imunológicas, tanto em situações normais quanto de inflamação exacerbada.

Concluindo, nossa pesquisa indica que o alelo CCR5 Δ 32 é um importante modificador no LES podendo ser considerado um fator de suscetibilidade à nefrite lúpica. Além disto, a presença deste alelo predispõe os pacientes a desenvolverem uma forma mais grave de nefrite, a nefrite classe IV. Em afro-descendentes estas evidências se mostraram muito mais acentuadas, o que realça a importância da interação deste alelo com o conjunto gênico destes pacientes. Estes resultados ressaltam a necessidade de mais estudos considerando o efeito da ausência ou menor expressão da molécula CCR5 na resposta imunológica e a importância da cautela no uso de terapias que inibam o alelo funcional.

4. Métodos

4.1. Pacientes e controles

Foram analisadas 354 (271 euro-descendentes e 83 afro-descendentes) amostras de DNA de pacientes com LES fornecidas pelo Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e 360 (160 euro-descendentes e 200 afro-descendentes) controles previamente genotipados [17, 32] provenientes do Laboratório de Hemostasia, Departamento de Genética da UFRGS. Estas amostras são provenientes da região Sul do Brasil. O presente projeto é parte integrante do Projeto 00-145, que estabeleceu o Banco de DNA, aprovado em 31.12.2001 no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

4.2. CCR5 Δ 32

Para a análise da variante CCR5 Δ 32, foi realizada a técnica de PCR e os genótipos foram visualizados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio, conforme descrito em [32].

4.3. Análises estatísticas

As frequências genotípicas do CCR5 foram comparadas com as frequências esperadas para Hary-Weinberg (HW) utilizando testes qui-quadrado. As frequências alélicas e genotípicas do CCR5 foram comparadas entre pacientes e controles usando o teste exato de Fisher. A correção de Bonferroni para múltiplas comparações foi aplicada quando o *P value* foi significativo. Como apenas um indivíduo em toda a amostra foi homozigoto para o alelo CCR5 Δ 32, as análises foram conduzidas considerando os pacientes como portador ou não portador do alelo CCR5 Δ 32. Os

riscos relativos foram estimados pelo *odds ratio*. Médias para o SLICC e SLEDAI foram analisadas pelo teste Mann-Whitney. Razões de prevalência foram obtidas usando a regressão de Poisson com variância robusta. O nível de significância foi estabelecido com $\alpha = 0,05$ (bicaudal), e todas as análises estatísticas foram realizadas com os programas SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) e winPEPI [33].

Agradecimentos

Agradecemos à FAPERGS pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] Cotran RS, Kumar V., Robbins, S.L. . Robbins & Cotran. Patologia. Bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro; 2005. p. 239-245.
- [2] Borchers AT, Naguwa SM, Shoenfeld Y, Gershwin ME. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2009;9:A277-287.
- [3] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
- [4] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-1277.
- [5] Doodes PD, Cao Y, Hamel KM, Wang Y, Rodeghero RL, Kobezda T, Finnegan A. CCR5 is involved in resolution of inflammation in proteoglycan-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:2945-2953.
- [6] Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhardt M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996;381:661-666.
- [7] Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996;381:667-673.
- [8] Zimmerman PA, Buckler-White A, Alkhatib G, Spalding T, Kubofcik J, Combadiere C, Weissman D, Cohen O, Rubbert A, Lam G, Vaccarezza M, Kennedy PE, Kumaraswami V, Giorgi JV, Detels R, Hunter J, Chopek M, Berger EA, Fauci AS, Nutman TB, Murphy PM. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol Med* 1997;3:23-36.
- [9] Vargas AE, Cechim G, Correa JF, Gomes PA, Macedo Gde S, de Medeiros RM, Perotoni G, Rauber R, Villodre ES, Chies JA. Pros and cons of a missing chemokine receptor--comments on "Is the European spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5-D32 allele formed by a breakdown of the pathocenosis due to the historical Roman expansion?" by Eric Faure and Manuela Royer-Carenzi (2008). *Infect Genet Evol* 2009;9:387-389.
- [10] Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet* 1997;16:100-103.
- [11] Lim JK, McDermott DH, Lisco A, Foster GA, Kryzstof D, Follmann D, Stramer SL, Murphy PM. CCR5 deficiency is a risk factor for early clinical manifestations of West Nile virus infection but not for viral transmission. *J Infect Dis*;201:178-185.

- [12] Gade-Andavolu R, Comings DE, MacMurray J, Rostamkhani M, Cheng LS, Tourtellotte WW, Cone LA. Association of CCR5 Δ 32 deletion with early death in multiple sclerosis. *Genet Med* 2004;6:126-131.
- [13] Chies JA, Nardi NB. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypotheses* 2001;57:46-50.
- [14] Vargas AE, da Silva MA, Silla L, Chies JA. Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease. *Tissue Antigens* 2005;66:683-690.
- [15] Herfarth H, Pollok-Kopp B, Goke M, Press A, Oppermann M. Polymorphism of CC chemokine receptors CCR2 and CCR5 in Crohn's disease. *Immunol Lett* 2001;77:113-117.
- [16] Scheibel I, Veit T, Neves AG, Souza L, Prezzi S, Machado S, Kohem C, Icarelli M, Xavier R, Brenol JC, Chies JA. Differential CCR5 Δ 32 allelic frequencies in juvenile idiopathic arthritis subtypes: evidence for different regulatory roles of CCR5 in rheumatological diseases. *Scand J Rheumatol* 2008;37:13-17.
- [17] Kohem CL, Brenol JC, Xavier RM, Bredemeier M, Brenol CV, Dedavid e Silva TL, de Castilhos Mello A, Canedo AD, Neves AG, Chies JA. The chemokine receptor CCR5 genetic polymorphism and expression in rheumatoid arthritis patients. *Scand J Rheumatol* 2007;36:359-364.
- [18] Aguilar F, Nunez-Roldan A, Torres B, Wichmann I, Sanchez-Roman J, Gonzalez-Escribano MF. Chemokine receptor CCR2/CCR5 polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2003;30:1770-1774.
- [19] Mamtani M, Rovin B, Brey R, Camargo JF, Kulkarni H, Herrera M, Correa P, Holliday S, Anaya JM, Ahuja SK. CCL3L1 gene-containing segmental duplications and polymorphisms in CCR5 affect risk of systemic lupus erythaematosus. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1076-1083.
- [20] The American College of Rheumatology response criteria for systemic lupus erythematosus clinical trials: measures of overall disease activity. *Arthritis Rheum* 2004;50:3418-3426.
- [21] Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, Bacon P, Bombardieri S, Hanly J, Hay E, Isenberg D, Jones J, Kalunian K, Maddison P, Nived O, Petri M, Richter M, Sanchez-Guerrero J, Snaith M, Sturfelt G, Symmons D, Zoma A. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996;39:363-369.
- [22] Monticielo OA, Chies JA, Mucenic T, Rucatti GG, Junior JM, da Silva GK, Glesse N, dos Santos BP, Brenol JC, Xavier RM. Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*;19:280-287.
- [23] Burling F, Ng J, Thein H, Ly J, Marshall MR, Gow P. Ethnic, clinical and immunological factors in systemic lupus erythematosus and the development of lupus nephritis: results from a multi-ethnic New Zealand cohort. *Lupus* 2007;16:830-837.
- [24] Bastian HM, Alarcon GS, Roseman JM, McGwin G, Jr., Vila LM, Fessler BJ, Reveille JD. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort (LUMINA) XL II: factors predictive of new or worsening proteinuria. *Rheumatology (Oxford)* 2007;46:683-689.
- [25] Naiker IP, Chrystal V, Randeree IG, Seedat YK. The significance of arterial hypertension at the onset of clinical lupus nephritis. *Postgrad Med J* 1997;73:230-233.
- [26] Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, Balow JE, Bruijn JA, Cook T, Ferrario F, Fogo AB, Ginzler EM, Hebert L, Hill G, Hill P, Jennette JC, Kong NC, Lesavre P, Lockshin M, Looi LM, Makino H, Moura LA, Nagata M. The

- classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:241-250.
- [27] Stasikowska O, Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M. The significant role of RANTES and CCR5 in progressive tubulointerstitial lesions in lupus nephropathy. *Pol J Pathol* 2007;58:35-40.
- [28] Gomez-Reino JJ, Pablos JL, Carreira PE, Santiago B, Serrano L, Vicario JL, Balsa A, Figueroa M, de Juan MD. Association of rheumatoid arthritis with a functional chemokine receptor, CCR5. *Arthritis Rheum* 1999;42:989-992.
- [29] Navratilova Z. Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2006;150:191-204.
- [30] Ariel A, Fredman G, Sun YP, Kantarci A, Van Dyke TE, Luster AD, Serhan CN. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nat Immunol* 2006;7:1209-1216.
- [31] Telenti A. Safety concerns about CCR5 as an antiviral target. *Curr Opin HIV AIDS* 2009;4:131-135.
- [32] Chies JA, Hutz MH. High frequency of the CCR5 Δ 32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:71-75.
- [33] Abramson JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *Epidemiol Perspect Innov* 2004;1:6.

TABELAS DO ARTIGO CIENTÍFICO

Tabela 1: Características clínicas dos pacientes.

Características Clínicas dos pacientes	N/N total (%)
Rash malar	230/354 (54,5)
Rash discóide	56/354 (15,8)
Fotossensibilidade	268/354 (75,7)
Úlceras orais/nasais	127/354 (35,9)
Artrite	293/354 (82,8)
Serosite	110/354 (31,2)
Pleurite	91/353 (25,8)
Pericardite	53/353 (15,0)
Complicações neurológicas	39/354 (11,0)
Psicose	22/354 (6,2)
Convulsões	22/354 (6,2)
Nefrite	154/200 (43,1)
Manifestações hematológicas	275/354 (77,7)
Anemia hemolítica	107/354 (30,2)
Leucopenia/linfopenia	220/354 (62,1)
Plaquetopenia	71/354 (20,1)
FAN positivo	351/353 (99,4)
Anti-DNA	171/352 (48,6)
Anti-Sm	70/350 (20,0)
Anticardiolipina IgG/IgM	101/351 (28,8)
Anticoagulante lúpico	27/352 (7,7)
VRDL falso positivo	17/352 (4,8)
Anti-Ro	145/328 (44,2)
Anti-La	45/328 (13,7)
Anti-RNP	105/328 (32,0)
Anti-Scl 70	10/328 (3,0)

Tabela 2: Frequências genotípicas e fenotípicas entre pacientes e controles estratificando por etnia.

	Euro-descendentes		Afro descendentes	
	Pacientes (%)	Controles (%)	Pacientes (%)	Controles (%)
Genótipos				
CCR5/CCR5	259 (95,57)	150 (93,75)	77 (92,77)	194 (97,00)
CCR5/CCR5Δ32	12 (4,43)	10 (6,25)	5 (6,02)	6 (3,00)
CCR5Δ32/CCR5Δ32	0 (0)	0 (0)	1 (1,21)	0 (0)
P (Fischer)	0,5		0,15	
Alelos				
CCR5	530 (97,79)	310 (96,88)	159 (95,78)	394 (98,50)
CCR5Δ32	12 (2,21)	10 (3,13)	7 (4,22)	6 (1,50)
P (Fischer)	0,5		0,064	

Tabela 3: Distribuição do CCR5Δ32 em pacientes com nefrite e distribuição por classes de nefrite segundo a OMS, estratificada por origem étnica.

	Euro-descendentes		Afro-descendentes	
	Portadores	Não portadores	Portadores	Não portadores
	CCR5Δ32 (%)	CCR5Δ32 (%)	CCR5Δ32 (%)	CCR5Δ32 (%)
Nefrite				
Não	7 (4,57)	146 (95,42)	0 (0)	44 (100)
Confirmada por biópsia	3 (3,06)	95 (96,94)	5 (15,63)	27 (84,37)
P (Fischer)	0,745		0,011	
P corrigido	1,0		0,044	
Classe de Nefrite OMS				
II	0 (0)	14 (100)	1 (11,11)	8 (88,89)
III	0 (0)	27 (100)	0 (0)	7 (100)
IV	3 (9,68)	28 (90,32)	4 (36,36)	7 (63,64)
V	0 (0)	20 (100)	0 (0)	4 (100)
VI	0 (0)	6 (100)	0 (0)	1 (100)
P (Fischer)	0,524		0,004^a	
P corrigido	1,0		0,016	

^a Incluindo pacientes sem nefrite

Tabela 4: Comparando pacientes com nefrite classe IV com outros pacientes (com outra classe de nefrite e sem nefrite).

Nefrite	Euro-descendentes		Afro-descendentes	
	Portadores CCR5Δ32 (%)	Não portadores CCR5Δ32 (%)	Portadores CCR5Δ32 (%)	Não portadores CCR5Δ32 (%)
Outra Classe/Sem nefrite	7 (3,18)	213 (96,82)	1 (1,54)	64 (98,46)
Classe IV	3 (9,68)	28 (90,32)	4 (36,36)	7 (63,64)
OR (CI95%)	3,37 (0,52 - 15,81)		36,57 (2,82-1826)	

Tabela 5: Regressão de Poisson - Fatores predisponentes à nefrite classe IV em pacientes com LES.

Variável	RP	95% IC	P (Fisher)
Portador CCR5Δ32	4.05	2.42 - 6.78	9.9⁻⁸
Anti-dsDNA	1.73	0.98 - 3.04	0.059
Hipertensão	3.11	1.57 - 6.15	0.001
Idade de diagnóstico	0.956	0.937 - 0.976	1.4 ⁻⁵

IC, intervalo de confiança; RP, razão de prevalência.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho sugere que o alelo CCR5 Δ 32 é um importante modificador no LES podendo ser considerado um fator de suscetibilidade para o desenvolvimento de nefrite lúpica. Além disto, a presença deste alelo predispõe os pacientes a uma forma mais grave de nefrite, a nefrite classe IV. Em afro-descendentes estas evidências se mostraram acentuadas, o que realça a importância da interação deste alelo com o conjunto gênico destes pacientes. Estes resultados ressaltam a necessidade de mais estudos que levem em consideração o efeito da ausência ou da baixa expressão de CCR5 na resposta imunológica e a importância de cautela no uso de terapias que inibam esta molécula.

Nossas perspectivas são analisar as frequências alélicas e genotípicas das variantes gênicas de outro receptor de quimiocinas importante no contexto de infecções virais (o receptor CCR2), através da análise da variante CCR2V64I, além de avaliar o repertório potencial de células T através da análise do gene *TCRBV20S1*, em pacientes com LES e verificar uma possível associação das mesmas com características clínicas e sintomatologia destes pacientes. Também temos como perspectiva aumentar o número de pacientes e controles do presente estudo.

REFERÊNCIAS

Referências eletrônicas

Lupus Foundation of America. *What are the Symptoms of Lupus*
http://www.lupus.org/webmodules/webarticlesnet/templates/new_learnunders_tanding.aspx?articleid=2235&zoneid=523. Acesso em: 28 jun. 2010.

Referências Gerais

- [1] Cotran RS, Kumar, V., Robbins, S.L. . Robbins & Cotran. Patologia. Bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro; 2005. p. 239-245.
- [2] Borchers AT, Naguwa SM, Shoenfeld Y, Gershwin ME. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2009;9:A277-287.
- [3] Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
- [4] Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-1277.
- [5] Doodes PD, Cao Y, Hamel KM, Wang Y, Rodeghero RL, Kobezda T, Finnegan A. CCR5 is involved in resolution of inflammation in proteoglycan-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:2945-2953.
- [6] Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996;381:661-666.
- [7] Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996;381:667-673.
- [8] Zimmerman PA, Buckler-White A, Alkhatib G, Spalding T, Kubofcik J, Combadiere C, Weissman D, Cohen O, Rubbert A, Lam G, Vaccarezza M, Kennedy PE, Kumaraswami V, Giorgi JV, Detels R, Hunter J, Chopek M, Berger EA, Fauci AS, Nutman TB, Murphy PM. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol Med* 1997;3:23-36.
- [9] Vargas AE, Cechim G, Correa JF, Gomes PA, Macedo Gde S, de Medeiros RM, Perotoni G, Rauber R, Villodre ES, Chies JA. Pros and cons of a missing chemokine receptor--comments on "Is the European spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5-D32 allele formed by a breakdown of the pathocenosis due to the historical Roman expansion?" by Eric Faure and Manuela Royer-Carenzi (2008). *Infect Genet Evol* 2009;9:387-389.

- [10] Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet* 1997;16:100-103.
- [11] Galvani AP, Slatkin M. Evaluating plague and smallpox as historical selective pressures for the CCR5-Δ 32 HIV-resistance allele. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15276-15279.
- [12] Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Allikmets R, Schriml L, Gerrard B, Malasky M, Ramos MD, Morlot S, Tzetis M, Oddoux C, di Giovine FS, Nasioulas G, Chandler D, Aseev M, Hanson M, Kalaydjieva L, Glavac D, Gasparini P, Kanavakis E, Claustres M, Kambouris M, Ostrer H, Duff G, Baranov V, Sibul H, Metspalu A, Goldman D, Martin N, Duffy D, Schmidtke J, Estivill X, O'Brien SJ, Dean M. Dating the origin of the CCR5-Δ32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *Am J Hum Genet* 1998;62:1507-1515.
- [13] Faure E, Royer-Carenzi M. Is the European spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5-Δ32 allele formed by a breakdown of the pathocenosis due to the historical Roman expansion? *Infect Genet Evol* 2008;8:864-874.
- [14] Biloglav Z, Zgaga L, Smoljanovic M, Hayward C, Polasek O, Kolcic I, Vitart V, Zemunik T, Boraska V, Torlak V, Mulic R, Ropac D, Grkovic I, Rudan D, Ristic S, Barbalic M, Campbell H, Wright AF, Rudan I. Historic, demographic, and genetic evidence for increased population frequencies of CCR5Δ32 mutation in Croatian Island isolates after lethal 15th century epidemics. *Croat Med J* 2009;50:34-42.
- [15] Lim JK, McDermott DH, Lisco A, Foster GA, Krysztof D, Follmann D, Stramer SL, Murphy PM. CCR5 deficiency is a risk factor for early clinical manifestations of West Nile virus infection but not for viral transmission. *J Infect Dis*;201:178-185.
- [16] Gade-Andavolu R, Comings DE, MacMurray J, Rostamkhani M, Cheng LS, Tourtellotte WW, Cone LA. Association of CCR5 Δ32 deletion with early death in multiple sclerosis. *Genet Med* 2004;6:126-131.
- [17] Chies JA, Nardi NB. Sickle cell disease: a chronic inflammatory condition. *Med Hypotheses* 2001;57:46-50.
- [18] Vargas AE, da Silva MA, Silla L, Chies JA. Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease. *Tissue Antigens* 2005;66:683-690.
- [19] Herfarth H, Pollok-Kopp B, Goke M, Press A, Oppermann M. Polymorphism of CC chemokine receptors CCR2 and CCR5 in Crohn's disease. *Immunol Lett* 2001;77:113-117.
- [20] Scheibel I, Veit T, Neves AG, Souza L, Prezzi S, Machado S, Kohem C, Icarelli M, Xavier R, Brenol JC, Chies JA. Differential CCR5Δ32 allelic frequencies in juvenile idiopathic arthritis subtypes: evidence for different regulatory roles of CCR5 in rheumatological diseases. *Scand J Rheumatol* 2008;37:13-17.
- [21] Kohem CL, Brenol JC, Xavier RM, Bredemeier M, Brenol CV, Dedavid e Silva TL, de Castilhos Mello A, Canedo AD, Neves AG, Chies JA. The chemokine receptor CCR5 genetic polymorphism and expression in rheumatoid arthritis patients. *Scand J Rheumatol* 2007;36:359-364.
- [22] Mamtani M, Rovin B, Brey R, Camargo JF, Kulkarni H, Herrera M, Correa P, Holliday S, Anaya JM, Ahuja SK. CCL3L1 gene-containing segmental

- duplications and polymorphisms in CCR5 affect risk of systemic lupus erythematosis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1076-1083.
- [23] Aguilar F, Nunez-Roldan A, Torres B, Wichmann I, Sanchez-Roman J, Gonzalez-Escribano MF. Chemokine receptor CCR2/CCR5 polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosis. *J Rheumatol* 2003;30:1770-1774.
- [24] Prahalad S. Negative association between the chemokine receptor CCR5-Δ32 polymorphism and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Genes Immun* 2006;7:264-268.
- [25] Garred P, Madsen HO, Petersen J, Marquart H, Hansen TM, Freiesleben Sorensen S, Volck B, Svejgaard A, Andersen V. CC chemokine receptor 5 polymorphism in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1998;25:1462-1465.
- [26] Martens HA, Kallenberg CG, Bijl M. Role of CCR5 Δ32 bp deletion in RA and SLE. *Autoimmunity* 2009;42:260-262.
- [27] Gomez-Reino JJ, Pablos JL, Carreira PE, Santiago B, Serrano L, Vicario JL, Balsa A, Figueroa M, de Juan MD. Association of rheumatoid arthritis with a functional chemokine receptor, CCR5. *Arthritis Rheum* 1999;42:989-992.

ANEXOS

NORMAS PARA APRESENTAÇÃO ORAL E ESCRITA DO TRABALHO EXPERIMENTAL DO ESTÁGIO EM PESQUISA E MONOGRAFIA

1. O trabalho experimental do aluno, realizado obrigatoriamente durante a atividade Estágio em Pesquisa e Monografia, deverá ser apresentado na forma escrita e oral ao final dos seis meses da atividade.
2. Aquele aluno que optar por realizar o Estágio Curricular Supervisionado em Biomedicina em atividade de pesquisa, sob a orientação do mesmo Professor/Pesquisador e na mesma linha de pesquisa do Estágio em Pesquisa e Monografia, poderá apresentar o seu trabalho ao final dos seis meses deste segundo estágio.

Do trabalho escrito:

1. O trabalho escrito deverá ser organizado da seguinte forma:
 - a. Folha de rosto com título, nome do aluno, nome do orientador, nome do co-orientador quando existente, curso e ano;
 - b. Agradecimentos e dedicatória (quando existentes);
 - c. Índice geral;
 - d. Resumo;
 - e. Introdução compreensiva;
 - f. Trabalho experimental na forma de artigo científico, seguindo a formatação exigida pelo periódico onde seria submetido, ainda que os resultados obtidos sejam apenas preliminares;
 - g. Conclusões e Perspectivas;
 - h. Bibliografia adicional que não esteja presente no artigo científico;
 - i. Anexos.
2. O aluno poderá optar por escrever o artigo científico, referido no item f acima, na língua inglesa.
3. O trabalho deverá ser impresso em folha A4, com tipo de letra tamanho 12, páginas numeradas a partir da folha de rosto e respeitando as seguintes margens:
 - a. Margem esquerda: 4,0 cm;
 - b. Margem direita: 2,5 cm;
 - c. Margem superior: 2,5 cm;
 - d. Margem inferior: 2,5 cm.
4. O aluno deverá entregar uma cópia impressa do trabalho escrito para cada membro da Banca Examinadora pelo menos 15 dias antes da apresentação oral.
5. O aluno deverá entregar à Comissão de Graduação uma cópia impressa e uma na forma eletrônica, em CD, do trabalho escrito, após terem sido efetuadas as correções solicitadas pela Banca Examinadora.

Da apresentação oral:

1. O aluno deverá apresentar oralmente o seu trabalho no dia e horário determinados pela Comissão de Graduação para este fim.

2. Será alocado a cada aluno 20 minutos para a apresentação oral e 10 minutos adicionais para argüição dos membros da Banca Examinadora.

Da Banca Examinadora:

1. A Banca Examinadora será constituída de dois professores, pesquisadores ou doutorandos indicados pelo orientador do aluno.
2. Não será exigida a presença dos integrantes da Banca Examinadora no dia da apresentação oral.

Do conceito final:

O conceito final do aluno será calculado a partir dos conceitos emitidos pelos integrantes da Banca Examinadora e do orientador do aluno.

NORMAS DA REVISTA *JOURNAL OF AUTOIMMUNITY*



Introduction

The *Journal of Autoimmunity* publishes papers related to the diverse aspects of autoimmunity: the mechanism of self-recognition, regulation of autoimmune responses, experimental autoimmune diseases, diagnostic autoantibody tests, and the epidemiology, pathophysiology, and treatment of autoimmune diseases. Special, but not exclusive, attention will be given to papers dealing with genetic, molecular biology, and cellular aspects of the discipline.

Page charges

This journal has no page charges.



Before You Begin

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>; *EC Directive 86/609/EEC for animal experiments* http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or

preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Should Authors be requested by the Editor to revise the text, the revised version should be submitted within eight weeks. After this period, the article will be regarded as a new submission.

Submit your article

Please submit your article via <http://www.elsevier.com/yjaut>.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names and addresses (including email addresses) of 5 potential referees.



Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the paper in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the paper. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Maximum image size: 400 × 600 pixels (h × w, recommended size 200 × 500 pixels). Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Research highlights

Research highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Research highlights are optional and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Research highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters per bullet point including spaces). See <http://www.elsevier.com/researchhighlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article in the abstract and also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical

Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.gmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Accession numbers

Accession numbers are unique identifiers in bioinformatics allocated to nucleotide and protein sequences to allow tracking of different versions of that sequence record and the associated sequence in a data repository [e.g., databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine ('GenBank') and the Worldwide Protein Data Bank]. There are different types of accession numbers in use based on the type of sequence cited, each of which uses a different coding. Authors should explicitly mention the *type of accession number together with the actual number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article. Please use the following format: accession number type ID: xxxx (e.g., MMDB ID: 12345; PDB ID: 1TUP). Note that in the final version of the *electronic copy*, accession numbers will be linked to the appropriate database, enabling readers to go directly to that source from the article.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version.

For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication". Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com>) and Reference Manager (<http://www.refman.com>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2000;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 1999, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by "et al." For further details you are referred to "Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals" (*J Am Med Assoc* 1997; 277: 927–934) (see also

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a maximum size of 30 MB and running time of 5 minutes. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi: 10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted

for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.



Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.