

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA FERREIRA PICCELI

POLIMORFISMOS DOS GENES *VSIG4* E *MASP1* EM PACIENTES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO

CURITIBA
2019

VANESSA FERREIRA PICCELI

POLIMORFISMOS DOS GENES *VSIG4* E *MASP1* EM PACIENTES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas, no Programa de Pós-Graduação em Ciência Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Iara Taborda de Messias-Reason.

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a. Fabiana Andrade

CURITIBA
2019

Picceli, Vanessa Ferreira

Polimorfismos dos genes *VSIG4* e *MASP1* em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico [recurso eletrônico] / Vanessa Ferreira Picceli – Curitiba, 2020.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2020.
Orientadora: Profa. Dra. Iara Taborda de Messias-Reason
Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana Andrade

1. Lúpus eritematoso sistêmico. 2. CRlg. 3. *VSIG4*. 4. *MASP1*. 5. Doenças autoimunes. I. Messias-Reason, Iara Taborda de. II. Andrade, Fabiana. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.772



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **VANESSA FERREIRA PICCELI** intitulada: **Polimorfismos dos genes VSIG4 e MASP1 em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico**, que após após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 10 de Setembro de 2019.

FABIANA ANTUNES DE ANDRADE
Presidente da Banca Examinadora

SAYONARA MENDES SILVA
Avaliador Externo (FACULDADE CATHEDRAL)

FERNANDA BOVO
Avaliador Externo (SECRETARIA DE ESTADO DA EDUCAÇÃO DO PARANÁ)

THELMA LAROCÇA SKARE
Avaliador Externo (FACULDADE EVANGELICA DO PARANA)

KARIN BRAUN PRADO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes com LES que acreditaram em nossos estudos e sem os quais este trabalho seria inviável.

À Professora Dra. Iara Tarboda de Messias-Reason, pela orientação, pelo carinho, acolhimento no laboratório e pelas constantes palavras de fé.

À Dra. Fabiana A. Andrade, pela co-orientação, paciência, dedicação e por compartilhar comigo dos momentos de “correria”. Sua contribuição foi de grande importância durante todo o doutorado e fundamental para a finalização da tese.

À Dra. Thelma Laroca Skare, pelo exemplo profissional e por nos acompanhar em todas as etapas deste trabalho, sempre muito atenciosa, disposta e eficiente.

Ao Professor Dr. Renato Nisihara, pelo apoio, incentivo e contribuição no aprendizado.

À Camila de Freitas Oliveira Tré pelo auxílio na realização da parte prática e teórica deste trabalho, obrigada por dedicar seu tempo em me ajudar.

A todos os funcionários e alunos do Laboratório de Imunopatologia da UFPR, que me ajudaram, ensinaram e também estiveram ao meu lado para a conclusão desta pesquisa; construímos uma amizade muito bonita.

Aos meus amigos, sempre muito companheiros, me apoiando nos momentos de dificuldade.

Ao CNPq, pela bolsa recebida em parte do período de doutorado, que proporcionou auxílio financeiro para execução do projeto e desta tese;

À coordenação do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

Agradeço de forma especial aos meus pais, Mario e Vânia, a meu irmão, Guga e ao meu namorado Guilherme Fadel Picheth, pela preocupação, enorme compreensão, ajuda e incentivo nos mais diversos momentos.

Agradeço a todos que me ajudaram na realização deste trabalho, direta e indiretamente, que me orientaram, incentivaram, aconselharam e cuidaram de mim durante todo este período. Nenhuma conquista é possível se não recebermos ajuda.

Agradeço a Deus, por tornar tudo isso possível.

RESUMO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune multissistêmica na qual existe a formação e deposição de autoanticorpos patogênicos e complexos imunes (CI), os quais se depositam em vários tipos de tecidos, provocando danos. Sabe-se que a ativação do sistema complemento (SC) por CI está diretamente relacionada à fisiopatologia da doença. Por um lado, sua ativação produz mediadores inflamatórios que causam dano tecidual, por outro, protege contra lesões através da depuração dos CIs. A proteína CRlg (*Complement Receptor of the Immunoglobulin superfamily*) é um receptor de macrófagos que apresenta um papel fundamental na depuração de patógenos, CI e células opsonizadas pelo complemento. A proteína MASP-1 ao ligar-se a lectina ligante de manose (MBL), desencadeia a via das lectinas que atua diretamente na ativação da via clássica, enquanto MASP-3 potencializa a via alternativa. Considerando o importante papel das proteínas CRlg e MASP1 na imunidade inata, o presente estudo avaliou a possível associação entre polimorfismos do gene *VSIG4* (que codifica CRlg) e *MASP1* (que codifica as proteínas MASP-1 e -3) e a suscetibilidade ao LES, além de danos sistêmicos associados como dermatológicos, oculares, renais, pleuropulmonares entre outros. Para isso, foram analisadas amostras de DNA de 179 pacientes (168 ♀ e 11 ♂; 18-72 anos) e 156 controles pertencentes a mesma área geográfica pareados quanto ao sexo, idade e ancestralidade. Um total de seis SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único) do gene *VSIG4* foram genotipados pelo método de PCR-SSP: rs2284705 e rs596448 na região promotora, rs5964488 no íntron 1, rs34581041 no éxon 2 e rs5964487 e rs9887348, ambos pertencentes ao íntron 3. Foram selecionados quatro polimorfismos do gene *MASP1*: rs13094773 localizado no íntron 1; rs698105, rs3864098 e rs1108450 localizados no íntron 2. O haplótipo *TGGCCG* do gene *VSIG4* foi mais frequente em mulheres com LES e diabetes ($p_{aju}=0.008$; OR 8.7; IC 95% [1.77-42]) e teste de Coombs direto positivo ($p_{aju}=0.015$; OR 5.4; IC 95% [1.38-21]), enquanto o haplótipo *TGACCG* foi prevalente naqueles que apresentaram artrite deformante ($p_{aju}=0.041$; OR 3.4; IC 95% [1.11-87]). Além disso, observamos uma associação entre os haplótipos *TGGCCG+TGACCG* de *VSIG4* e média do escore elevada no SLICC para mulheres (portadoras= 1.7 ± 1.3 vs. não portadoras= 1.0 ± 1.2 ; $p_{aju}=0.017$) sendo que, a maioria daquelas que possuem haplótipo *TGGCCG+TGACCG* (80%, 12/15) apresenta pelo menos um dano cumulativo ($p_{aju}=0.038$; OR 4.6; IC 95% [1.08-14]). Para *MASP1* observou-se que o alelo *rs13094773*A* está relacionado com suscetibilidade ao LES ($p_{aju}=0.003$; OR 1,75; IC 95% [1.22-2.52]), assim como o genótipo *rs13094773*AA* ($p_{aju}=0.004$; OR 2.1; IC 95% [1.27-3,49]). O alelo *rs698105*C* genótipo *rs698105*CC* foram relacionados a proteção ($p_{aju}=0.006$; OR 0.5; IC 95% [0.35-0.83] e $p_{aju}=0.0004$; OR 0.4; IC 95% [0.24-0.67]), já o *rs3864098*TT+CC* foi associado a catarata ($p_{aju}=0.017$; OR 5,7; IC 95% [1.17-30.11]), proteinúria ($p_{aju}=0.021$; OR 5.3; IC 95% [1.19-28.33]) e hipertensão pulmonar ($p_{aju}=0.015$; OR 5.8; IC 95% [1.1-30.64]). O haplótipo *ATCC* ($p_{aju}=0.0000001$; OR 20.6; IC 95% [10.6-42.4]) aumenta em 20 vezes a suscetibilidade ao LES. Nossos resultados sugerem um papel para os polimorfismos do *VSIG4* e *MASP1* na fisiopatologia do LES, possivelmente contribuindo no processo de inflamação e dano tecidual devido a ativação excessiva do complemento.

Palavras chave: lúpus sistêmico eritematoso; CRlg, *VSIG4*, *MASP1*, sistema complemento, doença autoimune.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multisystemic autoimmune disease that occurs due to the formation of pathogenic autoantibodies and immune complexes (IC), which deposit in various types of tissues, causing damage. The activation of the complement system by ICs is known to be directly related to the pathophysiology of the disease. Its activation may produce inflammatory mediators that cause tissue damage; or it protects against injury by clearing the ICs. Complement Receptor of the Immunoglobulin superfamily (CRIg) is a macrophage receptor that plays a crucial role in the clearance of pathogens, ICs and autologous cells opsonized by complement. MASP-1 binds mannose-binding lectin (MBL) triggering the lectin pathway that acts directly on the activation of the classical pathway, while MASP-3 potentiates the alternative pathway. Considering the important role of CRIg and MASP1 proteins in innate immunity, the present study evaluated the possible association between VSIG4 (encoding CRIg) and MASP1 (encoding MASP-1 and -3) gene polymorphisms and susceptibility to SLE, in addition to permanent organ damage. Genetic variants present in VSIG4 and MASPI genes were assessed by the PCR-SSP method in up to 179 LES patients (168 ♀ and 11 ♂; 18-72 years) and 156 healthy controls from the same geographic area matched for sex, age, and ancestry. Six SNPs (single nucleotide polymorphism) in VSIG4 gene were genotyped: rs2284705 and rs596448 in the promoter region; rs5964488 in intron 1; rs34581041 in exon 2; and rs5988487 and rs9887348 both in intron 3. Four SNPs in MASP1 gene were evaluated: rs13094773 located in intron 1; and rs698105, rs3864098, and rs1108450 located in intron 2. The *VSIG4* TGGCCG haplotype was more frequent in women with SLE and diabetes ($p_{adj}=0.008$; OR 8.7; 95%IC [1.77-42]) and direct Coombs' test-positive ($p_{adj}=0.015$; OR 5.4; 95%IC [1.38-21]), while the *VSIG4* TGACCG was more prevalent in those with deforming arthritis ($p_{adj}=0.041$; OR 3.4, 95%IC [1.11-87]). Moreover, we observed an association between the *VSIG4* TGGCCG+TGACCG haplotypes and higher median of SLICC score in women (carriers= 1.7 ± 1.3 vs. non carriers median= 1.0 ± 1.2 ; $p_{adj}=0.017$) being that, most of *VSIG4* TGGCCG+TGACCG carriers (80%, 12/15) present at least one cumulative damage ($p_{adj}=0.038$; OR 4.6, 95%IC [1.08-14]). For *MASP1* gene, *rs13094773**A allele were related to susceptibility to SLE ($p_{aju}=0.003$; OR 1.75; 95% IC [1.22-2.52]), as well as *rs13094773**AA genotype ($p_{aju}=0.004$; OR 2.1; 95% IC [1.27-3.49]). The allele *rs698105**C and genotype *rs698105**CC were related to protection ($p_{aju}=0.006$; OR 0.5; 95% IC [0.35-0.83] and $p_{aju}=0.0004$; OR 0.4; 95% IC [0.24-0.67]), while *rs3864098**TT+CC were associated with cataract ($p_{aju}=0.017$; OR 5.7; 95% CI [1.17-30.11]), proteinuria ($p_{aju}=0.021$; OR 5.3; 95% CI [1.19-28.33]) and pulmonary hypertension ($p_{aju}=0.015$; OR 5.8; 95% CI [1.1-30.64]). The *MASP1* ATCC haplotype ($p_{aju}=0.0000001$; OR 20.6; 95% CI [10.6-42.4]) increases susceptibility to SLE by 20-fold. Our results suggest a role for *VSIG4* and *MASP1* polymorphisms in the pathophysiology of SLE, possibly contributing to the inflammation process and disease-related tissue damage due excessive complement activation.

Keywords: systemic lupus erythematosus; CRIg, *VSIG4*, *MASP1*, complement system, autoimmune disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - ORGÃOS E SISTEMAS COMPROMETIDOS NO LES.....	14
Figura 2 - APOPTOSE CELULAR DEVIDO EXPOSIÇÃO À LUZ ULTRAVIOLETA..	19
Figura 3 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO	35
Figura 4 - (a) RECEPTORES DO SISTEMA COMPLEMENTO E (b) OPSONIZAÇÃO MEDIADA POR C3b COM RECONHECIMENTO POR CR1g.....	37
Figura 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA E LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>VSIG4</i> NO CROMOSSOMO X	38
Figura 6 - TRANSCRITOS DO GENE <i>VSIG4</i> E ISOFORMAS (a) <i>VSIG4 001</i> , (b) <i>VSIG4-003</i> e (c).....	39
Figura 7- ESTRUTURA DO GENE <i>MASP1</i> E SUAS ISOFORMAS	43
Figura 8 - SNPs DO GENE <i>VSIG4</i> E PROTEÍNA CR1g	51
Figura 9 - PADRÃO ELETROFORÉTICO DA PCR-SSP REALIZADA PARA O GENE <i>VSIG4</i>	53
Figura 10 - GENE <i>MASP1</i> COM A LOCALIZAÇÃO DOS SNPS SELECIONADOS PARA O TRABALHO.	54
Figura 11 - PADRÃO ELETROFORÉTICO DA PCR-SSP MULTIPLEX REALIZADA PARA O GENE <i>MASP1</i>	56
Figura 12 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM LES EM FUNÇÃO DO SEXO.	57
Figura 13 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM LES EM FUNÇÃO DA FAIXA ETÁRIA	58
Figura 14 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM LES EM FUNÇÃO DA IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA (A) E DURAÇÃO DA DOENÇA (B).....	58
Figura 15 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM LES EM FUNÇÃO DO SEXO.	60
Figura 16 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM LES EM FUNÇÃO DA FAIXA ETÁRIA	61
Figura 17 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM LES EM FUNÇÃO DA IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA (A) E DURAÇÃO DA DOENÇA (B).....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos Iniciadores para Genotipagem do Gene <i>Vsig4</i>	50
Tabela 2 - Sequências dos primers do gene <i>MASP1</i> utilizados na PCR-SSP multiplex.	54
Tabela 3 - Frequência dos genótipos de <i>MASP1</i> encontrados na população geral, europeia e africana	55
Tabela 4 - Características dos pacientes e comparação com controles (<i>VSIG4</i>).....	57
Tabela 5 - Distribuição da amostra estudada de acordo com pontuação do Sledai .	59
Tabela 6 - Distribuição da amostra estudada quanto ao grau de dano cumulativo medido pelo SLICC/ACR-DI	59
Tabela 7 - Características dos controles e comparação com pacientes (<i>MASP1</i>) ...	60
Tabela 8 - Distribuição da amostra estudada de acordo com pontuação do Sledai .	62
Tabela 9 - Distribuição da amostra estudada quanto ao grau de dano cumulativo medido pelo SLICC/ACR-DI	62

LISTA DE ABREVIATURAS

AAN – Anticorpo antinuclear
aCI-IgA - anticardiolipina IgA
aCI-IgM - anticardiolipina IgM
ACR - American College of Rheumatology
AMA - Anticorpo anti-mitocôndria
AML - Anticorpo anti músculo liso
ATPase - Adenosina trifosfatase
DAI - Doença autoimune
Damp - Padrão molecular associado a dano celular
ds-DNA anticorpo anti DNA de dupla hélice
EBV – Vírus Epstein-Barr
FAN - Fator antinuclear
FCN3 – Ficulina 3
GI - gastrointestinal
HAI - Hepatite autoimune
HCV – Hepatite V
HLA - Antígeno leucocitário humano
IC - Imunocomplexo
IFR5 - Fator 5 regulador do interferon
KCs – Células de Kupffer
LES - Lúpus sistêmico eritematoso
LKM - Anticorpo antimicrosoma de fígado e rim
MAC - complexo de ataque a membrana
MBL - Lectina ligante de manose
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
NL – Nefrite lúpica
PAMP - Padrão molecular associado a patógeno
Pb – Pabes de base
PCR-SSP – Reação em cadeia da polimerase sequência específica
PRM – Molécula de reconhecimento padrão
RCA regulador de ativação de complemento
RNP - Ribonúcleo-proteína

SAF - Síndrome do anticorpo antifosfolípideo

SC - Sistema complemento

SLEDAI - Sístemic lupus erythematosus disease activity index

SLICC - Systemic Lupus International Collaborating Clinics

SLICC/ACR-DI (Systemic Lupus International Colaborating Clinics/ American College of Rheumatology – Damage Index),

SM - Smith

SNC - Sistema nervoso central

SNC – Sistema nervoso periférico

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TLR - Receptor *toll like*

TNF - Fator de necrose tumoral

VA - Via alternativa

VC – Via clássica

VHS - Velocidade de hemossedimentação

VL – Via das lectinas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 JUSTIFICATIVA.....	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVOGERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 FATORES DE PATOGENICIDADE NO LES.....	17
3.1.1 Fisiopatologia do LES.....	20
3.1.2 Manifestações Clínicas e Laboratoriais.....	22
3.1.3 Diagnóstico e Avaliação da Atividade da Doença.....	26
3.2 SISTEMA COMPLEMENTO.....	31
3.2.1 Sistema Complemento e LES.....	31
3.2.2 Família dos Receptores de Complemento.....	36
3.2.3 CRlg.....	37
3.3 MASP-1.....	42
3.3.1 Gene <i>MASP-1</i>	44
3.3.2 Proteína MASP-1.....	44
3.3.3 Proteína MASP-3.....	45
3.3.4 Proteína MAp44.....	46
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	47
4.1 CASUÍSTICA.....	47
4.1.1 Pacientes.....	47
4.1.2 Grupo Controle.....	48
4.2 MÉTODO.....	48
4.2.1 Obtenção das amostras.....	48
4.2.2 Extração do DNA Genômico.....	49
4.2.3 Análise de Polimorfismos por PCR-SSP.....	49
4.3 PCR-SSP DOP GENE <i>VSIG4</i>	50
4.4 PCR-SSP (MULTIPLEX) DO GENE <i>MASP1</i>	53
4.5 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO.....	56
4.5.1 Caracterização da população de pacientes em estudo – <i>VSIG4</i>	56

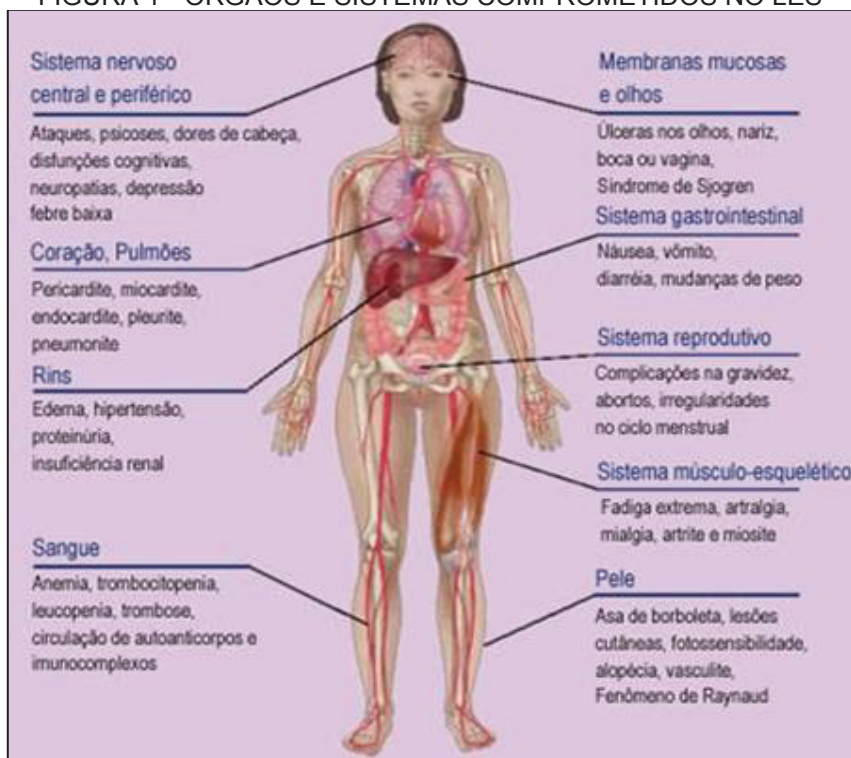
4.5.2 Caracterização da População de pacientes em Estudo.....	59
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1 ARTIGO VSIG4 – SHORT COMMUNICATION.....	64
5.2 ARTIGO MASP1 – SHORT COMMUNICATION.....	79
6 CONCLUSÃO.....	90
7 REFERÊNCIAS.....	92
APÊNDICE.....	104
ANEXOS.....	109

1 INTRODUÇÃO

O LES é uma doença autoimune multissistêmica na qual existe formação de autoanticorpos patogênicos e complexos antígeno-anticorpos provocando danos teciduais. Os desencadeantes moleculares da doença ainda não foram determinados, mas sua patogênese está relacionada às múltiplas especificidades dos autoanticorpos, principalmente a alta reatividade de proteínas plasmática por antígenos nucleares (Kuo, Grainge et al. 2015, Durcan, O'Dwyer et al. 2019, Sawada, Fujimori et al. 2019).

O LES pode provocar quadros inflamatórios em diferentes sistemas do organismo sendo, portanto, caracterizado como uma doença heterogênea, que permite que os pacientes apresentem várias combinações de manifestações clínicas (Figura 1). Na maioria dos casos a doença se caracteriza por uma evolução clínica com períodos de exacerbação e remissões, apesar de alguns pacientes apresentarem um padrão de atividade crônica (Kim, Bang et al. 2016, Goldman and Schafer 2018).

FIGURA 1 - ORGÃOS E SISTEMAS COMPROMETIDOS NO LES



FONTE: <http://www.misodor.com/LUPUS.html> ACESSO 10/04/2019.

Embora ambos os sexos possam ser afetados, esta doença atinge predominantemente mulheres em idade reprodutiva, em uma proporção de

aproximadamente 9 mulheres para cada homem. A prevalência do LES já está bem estabelecida em países da Europa e América Central, com taxas que variam de 20-200 casos a cada 100.000 pessoas, já a incidência é de 2,2 a 23,1 por 100.000 ao ano (Klumb, Silva et al. 2015, Mocarzel, Lanzieri et al. 2015, Durcan, O'Dwyer et al. 2019).

Apesar do grande impacto na qualidade de vida, a incidência e prevalência no Brasil ainda é pouco descrita, alguns estudos demonstram uma estimativa de 16-80.000 casos diagnosticados no país (Mocarzel, Lanzieri et al. 2015). Bezerra et al. (2005) estimaram incidência de 8,7/100.000 habitantes na cidade de Natal (RN) no ano de 2000, caracterizando nesta região uma proporção muito maior (20:1) de mulheres com a doença. Em outro estudo realizado no estado do Paraná, encontrou-se proporção de 12,8:1 mulheres afetadas para cada homem. Crianças e idosos podem ser afetados mais raramente. A manifestação da doença antes dos 16 anos corresponde a 15-20% do total dos casos de LES e a incidência dessa forma juvenil da doença é estimada em 0,6 por 100.000 habitantes por ano nos EUA (Bezerra, Vilar et al. 2005, Picelli 2013, Mocarzel, Lanzieri et al. 2015, Macedo and Isaac 2016, Fava and Petri 2018, Durcan, O'Dwyer et al. 2019).

1.1 JUSTIFICATIVA

Nesse estudo, levantamos a hipótese de que alguns polimorfismos podem alterar a expressão dos genes *VSIG4* e *MASP1* e conseqüentemente a atividade de suas proteínas, desregulando o sistema complemento, o que interfere na eliminação de células apoptóticas, aumenta a reserva de autoantígenos, ou reduz a solubilidade dos IC, resultando em maior susceptibilidade ao LES e a atividade da doença. Estudos de associação dos genes *VSIG4* e *MASP1* com doenças autoimunes e inflamatórias tem sido realizados devido à importância desses genes na ativação e regulação do sistema complemento. Contudo, não há quaisquer estudos relacionando os polimorfismos selecionados e concentração plasmática de proteínas reguladoras do complemento, como CRlg, MASP-1 e MASP-3 no LES. Estudos desse tipo podem ajudar a esclarecer o papel da regulação do complemento na fisiopatologia dessa doença e tem o potencial de futuramente serem utilizados na implementação de medidas de correção, como a utilização de dessas proteínas solúveis no aprimoramento do manejo clínico desta doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se polimorfismos dos genes *VSIG4* e *MASP1* do complemento estão associados com a suscetibilidade ao LES e aos danos cumulativos em órgãos destes pacientes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar possível associação entre os polimorfismos dos genes *VSIG4* e *MASP1* e a suscetibilidade ou proteção ao LES.

- Investigar se os polimorfismos pesquisados estão associados ao perfil clínico e sorológico em pacientes com LES.

- Investigar se os polimorfismos pesquisados estão associados ao score de dano cumulativo avaliado através do índice SLICC/ACR-DI (Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ American College of Rheumatology – Damage Index e seus componentes).

- Investigar se os polimorfismos pesquisados estão associados a atividade da doença em pacientes com LES avaliados através do índice SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FATORES DE PATOGENICIDADE NO LES

O mecanismo de patogenicidade do LES ainda não se encontra bem elucidado, mas sabe-se que a combinação de fatores genéticos, imunológicos, ambientais e hormonais provoca o surgimento da doença (Chen, Krain et al. 2019).

Embora os fatores responsáveis pelo desenvolvimento do LES ainda não sejam completamente conhecidos, a predisposição genética é hoje considerada um elemento chave na susceptibilidade à doença e pode ser confirmada ao observar maior concordância de incidência da doença em gêmeos monozigóticos (11 A 50%) (Kluger, Melderis et al. 2016). Nas demais situações, o que se vê é uma ocorrência de história familiar em aproximadamente 10-12% dos casos, embora um número mais elevado de parentes apresente maior pré-disposição a manifestação de outras doenças autoimunes e sinais de distúrbio imunológico incompleto, como por exemplo, fator reumatoide positivo, presença de anticorpos anticardiolipina e anti-histonas, e diminuição de função de célula T supressora (Kluger, Melderis et al. 2016, Generali, Ceribelli et al. 2017).

Essa patogênese multifatorial baseia-se em um modelo hereditário poligênico em que a concomitância de genes de susceptibilidade eleva o risco de desenvolvimento da doença. Existem muitos estudos que tentaram identificar genes que possam contribuir para a susceptibilidade ao LES, contudo, muitos dos genes identificados ao longo do tempo continuam sem ter o seu papel na etiopatogênese do lúpus confirmado. Apesar da controvérsia, existem, contudo, alguns genes que reúnem algum consenso quanto ao seu papel na susceptibilidade ao LES. Entre estes encontram-se alguns alelos que codificam para antígenos de histocompatibilidade, componentes do complemento e receptores do componente Fc da IgG (FcγR) (Fonseca 2011).

A associação do LES ao antígeno leucocitário humano (HLA) foram observados em pacientes que expressam especificidades a autoanticorpos (Kim, Bang et al. 2016). Os pacientes com HLA-DR2 são mais propensos a produzir anticorpos anti-ds-DNA; aqueles com HLA-DR3 podem produzir quantidades mais copiosas de anti-Ro (SS-A) e anticorpos anti-La (SS-B), já os pacientes com HLA-DR4, tem maior produção do anticorpo anti-Smith. No entanto, a produção de anticorpos é parcialmente suprida pelos linfócitos T regulatórios,

que se acredita desempenhar um papel crítico na tolerância imunológica. Foi observada uma frequência aumentada dos alelos HLA-DR2 e DR3 em pacientes caucasianos com LES, enquanto os alelos DR3, DR4 e DR9 têm frequência aumentada em pacientes chineses, japoneses e coreanos, respectivamente (Kim, Bang et al. 2016).

Dentre os genes que podem explicar a maior suscetibilidade ao LES ou mesmo a maior gravidade, incluem aqueles que codificam componentes do sistema complemento (SC), como C1q, C1r, C2, C4 e de C5 a C9. Menor produção destes componentes do complemento pode diminuir a eliminação de células apoptóticas, aumentando assim a reserva de autoantígenos disponíveis, ou pode reduzir a solubilidade dos imunocomplexos, além de ocasionar a persistência de determinados agentes infecciosos, de maneira que estes causem uma estimulação imunológica prolongada (Ceribelli, Andreoli et al. 2009, Mocarzel, Lanzieri et al. 2015, Goldman and Schafer 2018). Neste contexto, justificam-se estudos visando ampliar a compreensão da participação do SC na fisiopatogenia da doença (Ghodke-Puranik and Niewold 2015, Generali, Ceribelli et al. 2017).

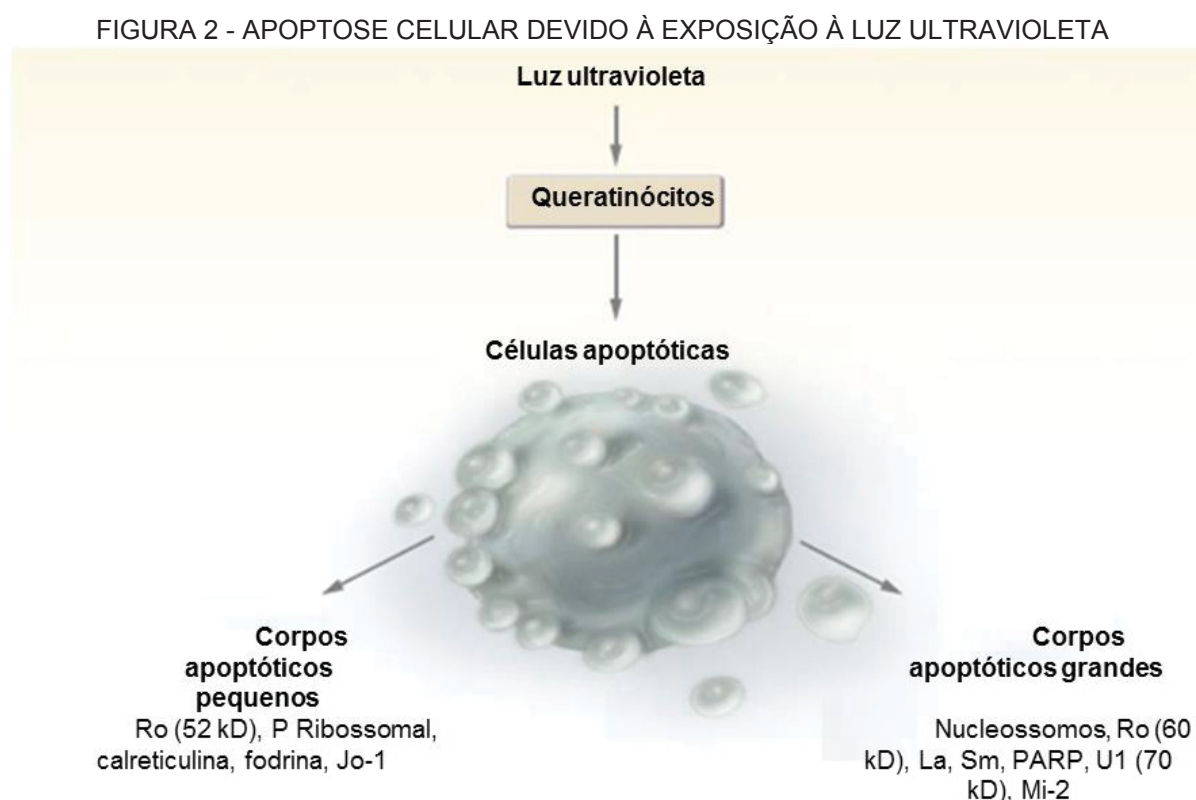
Outro achado imunopatológico é a associação dos polimorfismos nos genes *FCGE2a* e *FCGE3a* do receptor Fc com a nefrite lúpica, possivelmente devido à alteração na depuração dos imunocomplexos (Abdwani and Mani 2009, Lin, Seshasayee et al. 2015).

Variantes polimórficas do fator 5 regulador do interferon (IFR5) e genes *Tyk2*, ambos envolvidos na ativação da via do interferon tipo I, foram associados ao diagnóstico de LES em algumas populações, embora ainda não tenha sido demonstrada uma alteração da expressão ou da função dos produtos genéticos associados. Alelos dos genes *PDCD1* e *PTPN22*, que codificam proteínas que regulam negativamente a ativação de células T, também estão associados ao LES em algumas populações. Tem-se ainda que variantes genéticas do fator de necrose tumoral (TNF) e provavelmente genes de outras citocinas podem alterar as respostas da função imune e inflamatória. No LES, o ponto comum dos polimorfismos genéticos associados à doença é que estes conferem tanto o aumento da ativação como a diminuição da regulação das respostas imunes inatas ou adaptativas (Nath, Kilpatrick et al. 2004).

Acredita-se que agentes ambientais, incluindo infecções por vírus, estejam envolvidos na patogênese do LES, seja codificando proteínas que induzem autoanticorpos de reação cruzada (mimetismo molecular) para desencadear a autoimunidade subsequente dirigida por antígeno ou estimulando a produção do interferon tipo I de células dendríticas. O vírus Epstein-Barr tem despertado particular interesse dos investigadores devido à

frequência desta infecção no LES ser significativamente mais alta do que na população em geral. Estudos evidenciam que anticorpos contra o antígeno 1 do EBV reagem de forma cruzada com a proteína Ro, em modelos animais, sugerindo mecanismo de mimetismo molecular no LES. Barzilai et al. (2007), revelam que o valor médio de anticorpos IgG e IgM específico para citomegalovírus está elevado em pacientes com LES, quando comparado aos controles (Barzilai, Sherer et al. 2007).

A exposição à luz ultravioleta é bem definida como um desencadeante de exacerbação do lúpus. Os possíveis mecanismos que explicam essa observação incluem danos ao DNA e a indução de apoptose das células da pele, que determinam a concentração de ácidos nucléicos e de proteínas em vesículas na membrana celular, e consequente aumento na disponibilidade desses autoantígenos para o processamento por células apresentadoras de antígenos (Sontheimer 2005, Fava and Petri 2018). (FIGURA 2).



FONTE: Adaptado de (Bertsias, Ioannidis et al. 2008).

A associação de fotossensibilidade com a ocorrência do anticorpo anti-Ro/SS-A no LES tem recebido considerável atenção. Em estudo utilizando cultura de queratinócitos foi demonstrado que a exposição à radiação ultravioleta induz a expressão de antígenos

nucleares tais como Ro/SS-A, RNP (ribonúcleo-proteína) e antígenos SM (Smith) na superfície do queratinócito. Dessa forma, a deposição do anticorpo anti-Ro/SS-A fica significativamente aumentada pela luz ultravioleta. Esta exposição à luz também causa intensa alteração na membrana fosfolipídica dos queratinócitos, o que pode afetar o processo inflamatório; induz formação de citocinas, principalmente IL-1, a partir das células cutâneas e estimula a formação de células T supressora (Pacheco, Barahona-Correa et al. 2017).

Alguns dados reforçam a associação do tabagismo aos anticorpos anti-dsDNA de dupla hélice e com a atividade de doença. Drogas como procainamida e hidralazina, podem induzir uma síndrome semelhante ao lúpus, mas os sintomas geralmente regredem após a suspensão das mesmas. Essas drogas podem promover a desmetilação do DNA, aumentando assim, a disponibilidade de DNA imunoestimulante (O'Neill and Schrieber 2005). A composição da microbiota intestinal tem papel significativos na produção de células B (produção de anticorpos), na homeostase e no equilíbrio de várias subpopulações de células T auxiliares, o que leva a acreditar que distúrbios da microbiota (*Enterococcus gallinarum*) esteja relacionado ao desenvolvimento da autoimunidade no LES. Contudo, a associação entre estes fatores e a susceptibilidade ao LES ainda não está bem definida (Song, Fang et al. 2018).

Fatores endócrinos, como os estrogênios, podem desempenhar um papel essencial na patologia do lúpus, o que justificaria o predomínio da manifestação da doença no sexo feminino. Em 2016, Xue e colaboradores investigaram as funções e mecanismos do 17 beta-estradiol na expressão do indutor fraco do fator de necrose tumoral de apoptose (TWEAK) na nefrite lúpica (NL) e concluíram que o hormônio desempenha um papel crítico na regulação positiva da expressão de TWEAK, causando dano renal. Porém, evidências descrevem a provável contribuição de manifestações epigenéticas ou de efeitos no cromossomo X em detrimento dos efeitos hormonais como parte da explicação do desequilíbrio entre os sexos (Chang, Lan et al. 2002, Buyon, Petri et al. 2005).

3.1.1 Fisiopatologia do LES

Os fatores genéticos e ambientais que aumentam a probabilidade de aparecimento do LES podem agir sobre o sistema imune, induzindo autoimunidade e, por consequência, inflamação e dano tecidual.

Além dos mecanismos que aumentam a disponibilidade de autoantígenos, como a luz ultravioleta, alterações na expressão de produtos genéticos que regulam a apoptose ou a diminuição na eliminação de restos apoptóticos, a ativação global do sistema imune contribui para a autoimunidade no lúpus. Em semelhança aos eventos que estimulam as respostas imunes efetivas contra microrganismos exógenos, a autoimunidade que ocorre em pacientes com LES exige a ativação de resposta tanto do sistema imune inato como adaptativo. A resposta imune inata é inicialmente ativada por padrões moleculares comuns expressos nos microrganismos e determina um aumento da capacidade das células apresentadoras de antígenos, promovendo uma resposta imune adaptativa antígeno-específica. A família de receptores *Toll-like* (TLR) e os seus padrões de reconhecimento proporcionaram melhor compreensão dos mecanismos pelos quais o sistema imune inato é ativado por estímulos endógenos e exógenos e determinaram uma nova perspectiva sobre o importante papel de fatores adjuvantes que estimulam a resposta imune inata ao induzir uma resposta imune adaptativa bem-sucedida. Alguns estudos consideram que a perda do poder de diferenciação e reconhecimento dos TLR seja um dos fatores da autoimunidade no LES (Lee and Werth 2012, Goldman and Schafer 2018).

O aparecimento de inúmeros autoanticorpos, associados a uma falha na supressão de sua formação, constitui a anormalidade básica no LES. Com isto, formam-se complexos antígeno-anticorpos, os quais se depositam em vários tipos de tecidos e respondem, pelo menos parcialmente, pela clínica do paciente (Yaniv Sherer, Alexander Gorstein et al. 2004, Zhao, Zhou et al. 2016).

Os complexos imunes formados são removidos mais lentamente que o normal no LES, e este fato está relacionado tanto a deficiências herdadas ou adquiridas de proteínas do complemento, assim como a deficiência de receptores do mesmo das superfícies celulares, entre as quais deficiência de receptores de C3b na superfície dos eritrócitos-CR1 (Amano, Ferriani et al. 2008, Karamelic, Subasic et al. 2010, Sarma and Ward 2011). Deficiência genética de C1q, C2 e C4 são raras na população geral, porém a presença de alguma dessas condições já caracteriza forte predisposição ao LES. A deficiência de C1q constitui o maior risco genético para a doença, sendo associado em mais de 90% dos casos (Smykał-Jankowiak and Niemir 2009, Lood, Eriksson et al. 2012, Sawada, Fujimori et al. 2019). Experimentos com ratos que apresentavam ausência do gene que codifica para C1q demonstraram ocorrência de doença renal semelhante àquela causada pelo LES. A biópsia de rim dos animais revelou múltiplos depósitos de complexos imunes Davies et al. (1993)

relataram aumento na concentração de imunocomplexos no baço de paciente com deficiência de C2 e LES (Davies, Hillarby et al. 1993). De acordo com estudos realizados, percebe-se que a via clássica do SC contribui com a remoção dos complexos imunes e células apoptóticas, a via alternativa é um forte mediador da inflamação renal no lúpus, enquanto a via das lectinas estimula ativação das duas vias anteriores (Sekine, Ruiz et al. 2011, Schneider, Alegretti et al. 2012).

3.1.2 Manifestações Clínicas e Laboratoriais

O LES é uma doença que envolve praticamente todos os componentes do sistema imune e pode ser acompanhada de sintomas constitucionais semelhantes àqueles vistos no início de infecções bacterianas. Fadiga, cefaléia, perda de peso e febre são comuns, juntamente com a artralgia generalizada, mialgia e linfadenopatia (Goldman and Schafer 2018).

As manifestações clínicas da doença dependem principalmente do tipo de anticorpo presente, dos órgãos, células ou produtos das células atingidos e da capacidade do organismo corrigir esses defeitos. O paciente pode se apresentar com queixas referentes a um único sistema (com manifestações adicionais aparecendo mais tarde) ou a doença pode ser multissistêmica desde seu início (Sarma, 2011). Uma monitoração cuidadosa do acometimento de órgãos e sistemas é de fundamental importância para proporcionar ajustes terapêuticos em tempo hábil.

Muitos tipos de lesões cutâneas (pele e mucosas) podem aparecer no lúpus e cerca de 40-90% dos pacientes apresentam essas lesões como manifestação de fotossensibilidade após exposição à radiação solar ou artificial (lâmpadas fluorescentes ou halógenas) (Ahluwalia and Marsch 2019). O que diferencia a manifestação cutânea do LES causada por fotossensibilidade de outras manifestações não relacionadas ao LES é que ocorre uma reação exacerbada na pele, com aparecimento em alguns dias após a exposição e duração de aproximadamente 3 semanas, também pode estar associada a sintomas sistêmicos com artralgias e fadiga (Fava and Petri, 2018).

A erupção eritematosa facial, com distribuição em asa de borboleta pelas proeminências nasais e malaras, poupando as pregas nasolabiais, é a erupção cutânea clássica do LES, sendo observada em aproximadamente 50% dos pacientes e seu aparecimento geralmente acompanha os surtos de agudização da doença (protocolo clínico

e diretrizes terapêuticas, (Goldman and Schafer 2018)). O segundo achado de lesão aguda, em ordem de frequência, é uma erupção maculopapular, que pode ser pruriginosa e aparecer em qualquer parte do corpo, embora seja mais comum acima da cintura. A cura ocorre sem a formação de cicatriz ou defeito de pigmentação. Úlceras orais e nasais, em geral indolores, são achados em cerca de um terço dos pacientes (Goldman and Schafer 2018).

Alopecia pode aparecer de maneira difusa ou em placas sendo associada a apoptose de células do folículo capilar. A alopecia difusa é a mais comum e pode ser o primeiro sinal de uma reagudização da doença. Alopecia em placas é mais rara e pode ou não ter um *rash* discóide no fundo da lesão. O cabelo costuma crescer novamente quando a doença é controlada, e pode-se inclusive estimar o tempo de supressão da atividade inflamatória de um paciente pelo comprimento do cabelo que tornou a crescer (Goldman and Schafer 2018).

Os sintomas musculoesqueléticos com artralguas e artrites não erosivas são uma das características clínicas mais comuns do LES, sendo encontradas em quase 90% dos pacientes (Tani, Vagelli et al. 2018). As articulações interfalangianas proximais e metacarpofalangianas das mãos são as mais comumente sintomáticas, neste caso os pacientes se queixam de rigidez matinal, edema e dor. Joelhos e punhos também são muito acometidos nos casos de LES. O padrão de envolvimento articular costuma apresentar-se de forma simétrica e sem deformidades, a não ser em alguns casos raros, que atingem cerca de 10% dos pacientes, os quais apresentam deformidades decorrentes de danos ao tecido periarticular, incluindo tendões e cápsula articular, determinando uma condição designada de artropatia de Jaccoud (Lins and Santiago 2015, Budhram, Yuen et al. 2016, Zollars, Hyer et al. 2018). O líquido sinovial dos pacientes com artrite lúpica mostra uma contagem de leucócitos entre 2.000 e 15.000, sendo principalmente linfócitos. O acometimento muscular mais comum é a mialgia, que aparece em 40 a 50% dos casos. Já a miopatia, com elevação de creatina fosfoquinase, raramente ocorre no LES (5 a 11% dos casos) e pode ser observada como conseqüência da terapia com corticóides. A fibromialgia, caracterizada por dor difusa, é relatada em cerca de 40% dos pacientes e pode contribuir para achados de fadiga e depressão (Tani, Vagelli et al. 2018).

Por sua vez, alterações renais são frequentes no LES, aproximadamente 74% dos pacientes são acometidos em algum momento da evolução da doença, com predileção por alguns grupos étnicos como por exemplo afrodescendentes e asiáticos (La Paglia, Leone

et al. 2017, Yap, Yung et al. 2018, Durcan, O'Dwyer et al. 2019). A nefrite lúpica apresenta-se oscilando entre estados de atividade e remissão e é considerada a causa mais frequente do uso de doses elevadas de corticosteroides e imunossupressores, a condição que mais requer internação hospitalar, é um indicador de mau prognóstico e o principal fator relacionado ao aumento da mortalidade (Yap, Yung et al. 2018).

A doença renal geralmente é decorrente do depósito de imunocomplexos circulantes ou da formação local desses complexos nos glomérulos, levando a ativação do SC e subsequente recrutamento de células inflamatórias. A hipertensão pode ser decorrente de um envolvimento renal mais significativo o que caracteriza que o paciente com nefrite lúpica tem sobrevida menor que a população geral com LES sem nefrite (Vozmediano, Rivera et al. 2012).

As chances de que um indivíduo desenvolva lesão renal diminuem à medida que avança a idade do aparecimento da doença. Para aqueles pacientes que desenvolvem insuficiência renal, o transplante de rim é uma solução comprovada, embora a doença possa vir a recorrer no órgão transplantado (Toong, Adelstein et al. 2011).

Doença coronariana em paciente lúpico pode ser ocasionada por uma arterite das artérias coronárias, mas na grande maioria das vezes, é um reflexo de doença aterosclerótica precoce, a qual é vista principalmente em pessoas com hipertensão e síndrome nefrótica, tratadas com corticóides por pelo menos 1 ano. Pacientes com LES têm um risco considerável de morbidade e mortalidade cardiovascular devido a doença coronariana e aterosclerose acelerada, essa, quando precoce vem sendo cada vez mais reconhecida como sendo muito prevalente no lúpus, e as placas ateroscleróticas pré-clínicas nas carótidas têm sido descritas em 37% dos pacientes quando comparado a 15% de controles saudáveis. Embora não se tenha definido os mecanismos específicos do lúpus que confirmem um risco adicional para arterosclerose, é muito provável que a inflamação crônica associada à ativação do sistema imune agrave o dano vascular. A mortalidade devida à arterosclerose chega a ser até 10 vezes maior em pacientes com LES do que em controles saudáveis (Roman, Salmon et al. 2001, Kakuta, Dohi et al. 2016, La Paglia, Leone et al. 2017).

A pericardite é a manifestação cardíaca mais comum, e está associada à presença local de autoanticorpos e imunocomplexos. Normalmente se manifesta pela dor torácica subesternal que melhora com a inclinação para frente e pode ser exacerbada por inspiração

ou tosse. O diagnóstico é feito apenas através do ecocardiograma ou autópsia (Goldman and Schafer 2018).

Muitas características neuropsiquiátricas são descritas em pacientes com LES em relação ao sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso periférico (SNP), bem como transtornos psiquiátricos como, por exemplo, os distúrbios cognitivos e alteração de humor que passam muitas vezes despercebidos ou são atribuídos ao estresse causada pela doença (Di Battista, Marcucci et al. 2018). Uma avaliação correta depende de cuidadosa história clínica, exames físicos, laboratoriais e, em alguns casos, avaliação do líquido cefalorraquidiano e por métodos de imagem (Fava and Petri 2018). Manifestações do SNP, como polineuropatia, miastenia gravis e síndrome de Guillain-Barré, mesmo sendo raras, são uma das principais causas de morbidade (Quintanilla-González, Atisha-Fregoso et al. 2017, Toledano, Orueta et al. 2017).

O *American College of Rheumatology* definiu 19 síndromes neuropsiquiátricas que podem estar associadas ao LES. As manifestações mais comuns, provavelmente atribuíveis à cerebrite do lúpus incluem: disfunção cognitiva em 17% a 66% dos pacientes; psicose ou transtorno de humor, sendo a primeira relatada em até 8%; doença vascular cerebral em 5% a 18%; e convulsões em 6% a 51%. A vasculopatia não inflamatória de pequenos vasos é a forma de lesão mais comum, sendo responsável pela ocorrência de microinfartos. Este está relacionado com a presença do anticorpo antifosfolípideo que, por ser trombogênico, promove múltiplas embolias. As convulsões podem preceder o quadro completo do lúpus; enquanto a cefaléia, do tipo enxaqueca, pode ocorrer isoladamente e responde a aumento na dose de corticóides. Depressão e psicose são manifestações comuns do SNC em pacientes com LES, podendo aparecer anos antes de outras manifestações da doença. O envolvimento dos nervos cranianos e oculares, provavelmente devidos a vasculopatia e isquemia focal, pode, ocasionalmente, afetar a visão (Shoenfeld, Zandman-Goddard et al. 2008, Petri, Orbai et al. 2012, Fava and Petri 2018).

Algumas alterações nos exames laboratoriais são muito comuns no LES e podem ser encontrados no momento do diagnóstico ou podem ocorrer posteriormente, como parte do espectro clínico da doença ou induzido por medicamentos. A anemia é identificada em aproximadamente 50% dos pacientes e classicamente causada por anticorpos anti-eritrocitários, porém é multifatorial, podendo não estar associada a um teste de Coombs positivo ou à hemólise microangiopática, ou mesmo refletir uma doença crônica. A leucopenia, especialmente a linfopenia, é observada principalmente quando a doença está

ativa. Este quadro pode ser causado por efeito das drogas; presença de anticorpos específicos para linfócitos; tendência a apoptose espontânea dos linfócitos e depressão da medula óssea. Casos de leucocitose têm como principal causa infecção ou uso de corticóides. A púrpura trombocitopênica idiopática pode ser uma manifestação inicial do LES e a trombocitopenia, que acomete um terço dos pacientes, pode ser induzida por anticorpos antiplaquetários que podem causar hemorragia ou associadas a anticorpos antifosfolípides (Sarma and Ward 2011).

Os autoanticorpos mais característicos do LES têm como principal alvo as partículas intracelulares que contêm ácidos nucléicos e suas proteínas de ligação. Estudos sugerem que os autoanticorpos que reagem contra certas proteínas do RNA, como a proteína Ro, ocorrem precocemente em fase pré-clínica a doença, assim como a positividade para anticorpos antinucleares (FAN). Estes são seguidos pelo aparecimento de anticorpos anti-DNA e, posteriormente de anticorpos específicos para a proteína Smith (SM) e a ribonucleoproteína (RNP) quando próximos do diagnóstico (Yaniv Sherer, Alexander Gorstein et al. 2004, Goldman and Schafer 2018).

Apesar da variedade e diferente grau de acometimento no indivíduo, todas essas manifestações clínicas têm impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes, podendo levar à incapacidade e comprometimento funcional das atividades diárias. Já os achados laboratoriais auxiliam no diagnóstico da doença, assim como no acompanhamento de atividade da doença. Visto isso, considera-se de extrema importância a realização de uma avaliação clínica cuidadosa e comprometimento dos pacientes em seguir corretamente as instruções médicas.

3.1.3 Diagnóstico e Avaliação da Atividade e Dano Cumulativo da Doença

Por ser uma doença multissistêmica, muitas vezes de início insidioso e com apresentação clínica variável, o diagnóstico de LES é difícil, lento e raramente realizado na avaliação inicial, pois nenhuma alteração clínica ou biomarcador laboratorial, isoladamente, realiza o diagnóstico, apesar de algumas dessas alterações serem muito sugestivas de tal enfermidade (Durcan, O'Dwyer et al. 2019).

Em 1982, o *American College of Rheumatology* (ACR) propôs os critérios de classificação para LES, (Tan, Cohen et al. 1982), que foram revisados em 2019, originando o *European League Against Rheumatism/ American College of Rheumatology*

(EULAR/ACR-2019) (Lundberg, Tjärnlund et al. 2017). O novo critério classificatório para LES inclui 22 características relacionadas a doença, sendo que cada uma recebe um peso, sendo necessário completar pelo menos 10 pontos para a classificação como LES, porém mais de 50% dos pacientes não os preenchem ao mesmo tempo, ainda que todos eles completem os 10 pontos em algum momento da evolução da doença (Quadro 1). Apesar de não ser uma alternativa suficiente para diagnóstico, essa análise é útil em casos de dúvida na patologia, para auxiliar o clínico no diagnóstico; em estudos epidemiológicos; e para indicar atividade ou não da doença (Yu, Gershwin et al. 2014).

Ao longo dos anos, outros critérios diagnósticos foram surgindo, como o *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC'12), criado em 2012. Neste caso, o LES é classificado por presença de 4 dos 17 critérios (incluindo pelo menos um critério clínico e um imunológico), sendo considerados cumulativos e também não precisam estar presentes simultaneamente; ou por nefrite lúpica comprovada por biópsia na presença de FAN ou anti-DNA, sendo considerado um critério autônomo (Macedo and Isaac 2016).

QUADRO 1 – CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (EULAR/ACR-2019)

Criteria	Definition
Antinuclear antibodies (ANA)	ANA at a titre of $\geq 1:80$ on HEp-2 cells or an equivalent positive test at least once. Testing by immunofluorescence on HEp-2 cells or a solid phase ANA screening immunoassay with at least equivalent performance is highly recommended
Fever	Temperature $>38.3^{\circ}\text{C}$
Leucopenia	White blood cell count $<4.0 \times 10^9/\text{l}$
Thrombocytopenia	Platelet count $<100 \times 10^9/\text{l}$
Autoimmune haemolysis	Evidence of haemolysis, such as reticulocytosis, low haptoglobin, elevated indirect bilirubin, elevated lactate dehydrogenase (LDH) AND positive Coomb's (direct antiglobulin) test.
Delirium	Characterised by (1) change in consciousness or level of arousal with reduced ability to focus, (2) symptom development over hours to <2 days, (3) symptom fluctuation throughout the day, (4) either (4a) acute/subacute change in cognition (eg, memory deficit or disorientation), or (4b) change in behaviour, mood, or affect (eg, restlessness, reversal of sleep/wake cycle)
Psychosis	Characterised by (1) delusions and/or hallucinations without insight and (2) absence of delirium
Seizure	Primary generalised seizure or partial/focal seizure
Non-scarring alopecia	Non-scarring alopecia observed by a clinician*
Oral ulcers	Oral ulcers observed by a clinician*
Subacute cutaneous or discoid lupus	Subacute cutaneous lupus erythematosus observed by a clinician*: Annular or papulosquamous (psoriasiform) cutaneous eruption, usually photodistributed Discoid lupus erythematosus observed by a clinician*: Erythematous-violaceous cutaneous lesions with secondary changes of atrophic scarring, dyspigmentation, often follicular hyperkeratosis/haematological(scalp), leading to scarring alopecia on the scalp If skin biopsy is performed, typical changes must be present. Subacute cutaneous lupus: interface vacuolar dermatitis consisting of a perivascular lymphohistiocytic infiltrate, often with dermal mucin noted. Discoid lupus: interface vacuolar dermatitis consisting of a perivascular and/or periappendageal lymphohistiocytic infiltrate. In the scalp, follicular keratin plugs may be seen. In longstanding lesions, mucin deposition and basement membrane thickening may be noted
Acute cutaneous lupus	Malar rash or generalised maculopapular rash observed by a clinician If skin biopsy is performed, typical changes must be present: interface vacuolar dermatitis consisting of a perivascular lymphohistiocytic infiltrate, often with dermal mucin noted. Perivascular neutrophilic infiltrate may be present early in the course
Pleural or pericardial effusion	Imaging evidence (such as ultrasound, X-ray, CT scan, MRI) of pleural or pericardial effusion, or both
Acute pericarditis	≥ 2 of (1) pericardial chest pain (typically sharp, worse with inspiration, improved by leaning forward), (2) pericardial rub, (3) electrocardiogram (EKG) with new widespread ST-elevation or PR depression, (4) new or worsened pericardial effusion on imaging (such as ultrasound, X-ray, CT scan, MRI)
Joint involvement	EITHER (1) synovitis involving two or more joints characterised by swelling or effusion OR (2) tenderness in two or more joints and at least 30 min of morning stiffness
Proteinuria >0.5 g/24 hours	Proteinuria >0.5 g/24 hours by 24 hours urine or equivalent spot urine protein-to-creatinine ratio
Class II or V lupus nephritis on renal biopsy according to ISN/RPS 2003 classification	Class II: mesangial proliferative lupus nephritis: purely mesangial hypercellularity of any degree or mesangial matrix expansion by light microscopy, with mesangial immune deposit. A few isolated subepithelial or subendothelial deposits may be visible by immune-fluorescence or electron microscopy, but not by light microscopy Class V: membranous lupus nephritis: global or segmental subepithelial immune deposits or their morphological sequelae by light microscopy and by immunofluorescence or electron microscopy, with or without mesangial alterations
Class III or IV lupus nephritis on renal biopsy according to International Society of Nephrology/ Renal Pathology Society (ISN/RPS) 2003	Class III: focal lupus nephritis: active or inactive focal, segmental or global endocapillary or extracapillary glomerulonephritis involving $<50\%$ of all glomeruli, typically with focal subendothelial immune deposits, with or without mesangial alterations Class IV: diffuse lupus nephritis: active or inactive diffuse, segmental or global endocapillary or extracapillary glomerulonephritis involving $\geq 50\%$ of all glomeruli, typically with diffuse subendothelial immune deposits, with or without mesangial alterations. This class includes cases with diffuse wire loop deposits but with little or no glomerular proliferation
Positive antiphospholipid antibodies	Anticardiolipin antibodies (IgA, IgG, or IgM) at medium or high titre (>40 A phospholipids (APL), GPL or MPL units, or $>$ the 99th percentile) or positive anti- $\beta 2\text{GP1}$ antibodies (IgA, IgG, or IgM) or positive lupus anticoagulant
Low C3 OR low C4	C3 OR C4 below the lower limit of normal
Low C3 AND low C4	Both C3 AND C4 below their lower limits of normal
Anti-dsDNA antibodies OR anti-Smith (Sm) antibodies.	Anti-dsDNA antibodies in an immunoassay with demonstrated $\geq 90\%$ specificity for SLE against relevant disease controls OR anti-Sm antibodies

ISN/RPS International Society of Nephrology/Renal Pathology Society

*This may include physical examination or review of a photograph.

dsDNA, double-stranded DNA; SLE, systemic lupus erythematosus.

Fonte: Lundberg, Tjärnlund et al. (2017)

Os testes laboratoriais podem ser muito úteis para o diagnóstico de LES. Todos os elementos celulares do sangue podem ser afetados, de forma que o hemograma completo é essencial no auxílio do diagnóstico e no tratamento. Anemia normocítica, normocrômica e leucopenia, principalmente linfopenia, são achados comuns na doença ativa (Abbas, Gorial et al.).

O tempo parcial de tromboplastina prolongado pode indicar a presença de anticorpos antifosfolípidos patogênicos. A velocidade de hemossedimentação (VHS), embora seja um parâmetro muito inespecífico de inflamação sistêmica, é muitas vezes monitorada e pode indicar atividade da doença. Mesmo o VHS sendo considerado um exame pobre para o diagnóstico, é mais indicado que a proteína C reativa, uma proteína de fase aguda, que apresenta valores baixos, inclusive quando a doença está em atividade. Esta defasagem entre a proteína C reativa e VHS é bem útil em casos de febre, para separar a febre originária do lúpus daquela de uma infecção associada (Griffiths, Mosca et al. 2005).

O exame de urina com avaliação microscópica é outro exame laboratorial essencial em vista da frequência de proteinúria no lúpus, além disso, presença de proteínas, eritrócitos, leucócitos e cilindros celulares sugerem doença glomerular ativa (Edelbauer, Kshirsagar et al. 2011, Vozmediano, Rivera et al. 2012).

As proteínas do SC são ativadas por imunocomplexos, como aqueles que se formam em pacientes com LES. Os produtos de ativação que decorrem da clivagem enzimática dos componentes do complemento promovem inflamação, ligando-se aos receptores na superfície celular de fagócitos mononucleares, e indiretamente, agindo como agentes quimiotáticos no recrutamento de células inflamatórias. A diminuição dos dois componentes mais estáveis do complemento, o C3 e o C4, pode ser medida no soro, sendo esta redução de níveis indicativa de maior consumo e maior atividade da doença. Alguns laboratórios usam também como medida funcional a detecção da atividade total do complemento hemolítico (CH₅₀). Combinado com a titulação do anticorpo anti-dsDNA, a qual também está elevada durante a doença aguda, é um guia útil não só para o acompanhamento da doença como para a avaliação de eficácia do tratamento (Sarma and Ward 2011).

Uma avaliação clínica global determinada por cuidadosa história e exame físico associado a exames sanguíneos, urinário e sorológico suportam o diagnóstico de LES. Como observado em muitas outras doenças sistêmicas, infecções e malignidades, por terem um quadro clínico semelhante, devem ser incluídas no diagnóstico diferencial até o diagnóstico de certeza do LES (Abbas, Gorial et al. 2019).

Após o diagnóstico de LES, é importante determinar o grau de atividade da doença porque ela guiará a terapêutica. Um dos principais índices de atividade atualmente utilizado é o SELENA-SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) composto por 24 itens, dos quais 16 são referentes a características clínicas, incluindo sinais e

sintomas do paciente e 8 referentes a características laboratoriais (Anexo 1). Cada item recebe um peso (variando de 1 a 8), de acordo com sua importância ou gravidade, e no final estes pontos são somados resultando em um escore. Valores superiores a 6 indicam doença ativa, sendo necessário iniciar um tratamento medicamentoso; variação de três pontos entre uma visita e outra é aceita como ativação da doença; e variações maiores ou iguais a 12 pontos significam atividade grave (Freire, Souto et al. 2011), porém, apesar desses valores encontrados na literatura, eles variam dependendo do profissional que conduz o tratamento. Este questionário não é utilizado na rotina médica, apenas avalia a atividade da doença com relação aos últimos 10 dias que precederam a consulta, auxiliando o clínico na conduta do paciente (Touma, Gladman et al. 2011).

Nas últimas décadas, houve considerável melhora no manejo da doença e na taxa de sobrevivência, porém a morbidade causada por dano permanente aos órgãos permanece alta. Visto isso, em 1997 criou-se o SLICC/ACR-DI (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ American College of Rheumatology – Damage Index*), uma avaliação que mede a taxa de danos irreversíveis resultantes da atividade da doença, de seu tratamento e por comorbidades (ANEXO 2). Para evitar confusão entre atividade de doença e dano, são abordados 12 sistemas orgânicos que detectam danos ocorridos aos pacientes, a despeito de sua causa, podendo resultar da atividade da doença ou de sua terapia, como também de doenças intercorrentes como câncer e diabetes. Para ser considerado irreversível, o dano deve estar presente por pelo menos 6 meses, com exceção de infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral, que são registrados assim que ocorrem (Freire, Souto et al. 2011).

A heterogeneidade clínica e sorológica característicos do LES tornam o diagnóstico um grande desafio. Independente do critério adotado, sabe-se que nenhum é exato o suficiente para ser utilizado independente no diagnóstico, nesse caso, a atuação do reumatologista é essencial para avaliar o histórico clínico do paciente, juntamente com exames laboratoriais, principalmente os parâmetros hematológicos, urinários e perfil de auto anticorpos e assim chegar a um diagnóstico. Uma cuidadosa história medicamentosa também deve ser colhida, uma vez que diversas drogas podem desencadear síndromes semelhantes ao LES (Freire, Souto et al. 2011).

3.2 SISTEMA COMPLEMENTO

3.2.1 Sistema complemento e LES

O SC foi descoberto na década de 1890, quando sua função foi atribuída a “complementar” o processo de morte bacteriana através de anticorpos presentes no sangue. Atualmente, sabe-se que o SC é composto por mais de 35 proteínas plasmáticas e de superfície celular que participam da imunidade inata contra microrganismos, além de ser o principal mediador humoral do processo inflamatório. Esse complexo sistema está envolvido na resposta imunológica pela geração de fragmentos que promovem a lise celular, quimiotaxia das células inflamatórias, aumento da fagocitose por neutrófilos e macrófagos, participação na ativação de células B e T, e remoção de imunocomplexos (IC) circulantes e células apoptóticas (Macedo and Isaac 2016, Sawada, Fujimori et al. 2019)

As proteínas do SC são produzidas principalmente no fígado e são encontradas no plasma na sua forma inativa. Para que o SC exerça suas funções, este deve ser ativado, originando fragmentos com diferentes características e funções. A ativação ocorre de forma rápida, após influência de estímulo específico, seguido de uma cascata de auto-amplificação (Macedo and Isaac 2016). Existem três vias principais de ativação do complemento: a via clássica (VC), ativada predominantemente por anticorpos IgM ou IgG ligados aos antígenos; a via alternativa (VA), ativada nas superfícies das células microbianas e apoptóticas, na ausência de anticorpos; e a via das lectinas (VL), a qual é ativada por uma lectina ligante de manose (MBL), ficolinas ou colectinas que reconhecem resíduos de carboidratos nos microrganismos (Figura 3). Embora as vias de ativação do SC se diferenciem na forma como são iniciadas, todas resultam na geração de complexos enzimáticos (C3 convertases) capazes de clivar a proteína mais abundante do complemento, o componente C3. As vias alternativa e das lectinas são mecanismos efetores da imunidade natural, enquanto a via clássica é um componente fundamental da imunidade humoral adquirida (Lood, Eriksson et al. 2012, Beltrame, Boldt et al. 2015, Vignesh, Rawat et al. 2017).

Para que a atividade de opsonização e remoção de células apoptóticas e necróticas mediadas pelas proteínas do SC sejam efetivas, é necessária a perfeita regulação deste sistema. Caso exista uma ativação inapropriada ou deficiência de alguma proteína da cascata, ou mesmo uma ativação desregulada, alguns distúrbios podem surgir, como

ocorre nas DAIs. Nesse caso, os complexos imunes não são eliminados, o complemento torna-se cronicamente ativado, promovendo a inflamação (Sarma and Ward 2011, Beltrame, Boldt et al. 2015, Kremlitzka, Mácsik-Valent et al. 2016, Park, Raymond et al. 2019)

O complemento pode ser ativado nos tecidos por meio de complexos imunes, de fosfolipídeos e proteínas mitocondriais, expostos após isquemia tecidual e reperfusão. Esses ativam o complemento diretamente, ligando C1q ou MBL, ou indiretamente pelos anticorpos naturais ou proteína C reativa, que ativam a via clássica. O complemento que é ativado nos sítios de injúria tecidual vai causar dano pela deposição do complexo de ataque à membrana (MAC) e de ligantes com C4b e C3b que ativam leucócitos com receptores do complemento. As anafilatoxinas C3a e C5a liberadas também contribuem para amplificar a injúria ao promover ativação de células inflamatórias. Células e tecidos necróticos não expressam as moléculas regulatórias que previnem a ativação do complemento em tecidos normais (da Rosa Utiyama, da Silva Kotze et al. 2005).

No LES a ativação do complemento por complexos imunes que se depositam em múltiplos órgãos, está diretamente ligada a fisiopatologia da doença. A deficiência homocigótica hereditária de C1q, C1r, C1s, está fortemente associada com a susceptibilidade a doença, sendo que aproximadamente 93% dos pacientes têm deficiência de C1q e 60% com deficiência de C1r e C1s. O comprometimento na ativação da via clássica, decorrente dessa deficiência, já está bem caracterizado e vai refletir diretamente na solubilização, bem como na remoção dos complexos imunes, favorecendo o depósito destes principalmente nos rins, paredes de vasos e artérias (processo inflamatório). A participação do complemento na eliminação de células apoptóticas dos tecidos também é um fator importante na remoção de resíduos celulares, como componentes citoplasmáticos e nucleares parcialmente degradados. Diante de uma deficiência do complemento, principalmente de C1q, há falha na remoção desses resíduos, que pode também suscitar uma resposta autoimune (Abbas, Gorial et al. 2019). Ocorre também o reconhecimento inadequado de células do próprio organismo, causando ativação desnecessária de células B e T. Deficiência de C2 (30%) e C4 (70%) também está associada ao desenvolvimento de LES, embora a correlação não seja tão forte quanto a deficiência de C1q (Truedsson, Bengtsson et al. 2007).

Estudos ao longo das últimas três décadas gradualmente trouxeram melhor compreensão do papel da VA na fisiopatologia e na progressão do LES, ressaltando seu

envolvimento na gravidade da doença, relacionada em especial à nefrite lúpica, assim como nas manifestações extra renais (Bao and Quigg 2007, Sekine, Ruiz et al. 2011, Song, Guo et al. 2017).

A VA é ativada principalmente na superfície das células alvo, próprias ou microbianas, na ausência de anticorpos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007). Inicia-se com a hidrólise de C3, proteína do complemento mais abundante no plasma, em C3b, uma fração ativa que se liga covalentemente a superfície da célula alvo. A proteína Fator B (BF) liga-se à C3b, sendo clivada por uma serina protease plasmática denominada Fator D, originando um fragmento menor Bb, que permanece ligado ao C3b. Nas células alvo, o complexo formado (C3bBb) desencadeia a cascata de amplificação, pois é estabilizado pela proteína properdina, responsável pela ativação dos neutrófilos e pela prevenção da clivagem do complexo pelo Fator H, proteína reguladora da via alternativa. Em células normais do hospedeiro, o Fator H liga-se rapidamente ao complexo C3bBb, deixando este inativo. O destino da molécula de C3b ligada a uma superfície será determinado pela afinidade relativa de C3 ao fator H, regulador negativo, ou ao BF, regulador positivo da via alternativa (Sarma and Ward 2011).

Pesquisas sugerem que a regulação da VA é a chave para o controle do LES. Jessy *et al.* (2007) através de experimentos em ratos com lúpus cerebral, comparou o desenvolvimento da doença em um grupo que apresentava concentração de BF suprimida com um grupo que tinha a concentração normal. Observou-se que no primeiro grupo o depósito de IgG e C3 no cérebro estava reduzido, além de ocorrer diminuição na ativação dos neutrófilos e da apoptose, o que sugeriu diminuição na expressão da via alternativa como sendo um fator de proteção à cerebrite lúpica. Por sua vez, estudos de Boa *et al.* (2011), em ratos com deficiência no Fator H, demonstraram significativo aumento de albuminúria, depósito de imunocomplexos nos glomérulos, reação inflamatória nas paredes dos capilares, além de morte prematura por falência renal, enquanto o grupo controle não apresentou alterações significativas (Bao, Haas *et al.* 2011). O fator H é considerado um fator de proteção muito importante na nefrite lúpica, capaz de controlar a ativação de C3 causada pelo depósito de imunocomplexos nos glomérulos, impedindo o rápido avanço da doença. Os dados do estudo sugerem que a supressão do fator H acelera o desenvolvimento da nefrite lúpica. Ceribelli *et al.* (2009), avaliaram o sistema complemento durante fases diferentes do desenvolvimento do LES em humanos e chegaram a conclusões similares aos estudos anteriores, confirmando que a regulação do SC,

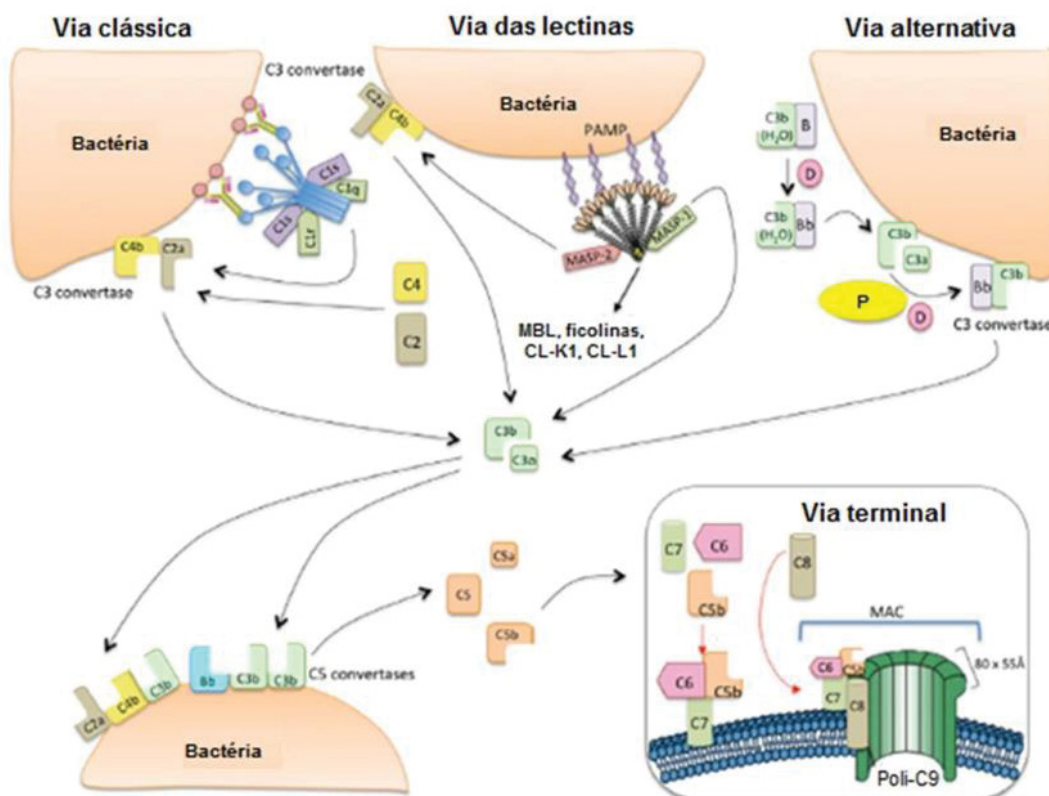
principalmente da via alternativa, pode retardar o desenvolvimento do LES. Os autores sugerem que a mesma pode ser considerada um potencial alvo terapêutico na doença.

Até o momento, sabe-se que 6 diferentes receptores de reconhecimento padrão (PRRs) desencadeiam a ativação da VL: 3 ficolinas (MFCOLIN, L-ficolina e H-ficolina, também conhecidas como ficolina-1, ficolina-2 e ficolina-3, respectivamente) e 3 colectinas (MBL, colectina 11 ou colectina de rim-1 ou CL-K1 e colectina 10 ou coletin-L1 ou CL-L1). Semelhante a VA, a VL pode ser ativada na ausência de complexos imunes pela ligação de PRMs (moléculas de reconhecimento padrão) a carboidratos ou compostos acetilados nas superfícies de patógenos (PAMPs) ou células apoptóticas (DAMPs). Os PRMs formam complexos com as serinas proteases, MASPs (MASPs 1 e 2), e com proteínas associadas a MBL (MAps19 e 44) (Hisano, Matsushita et al. 2007, Dobó, Major et al. 2011, Jani, Kajdacs et al. 2014). Após a ligação dos complexos PRR / MASP aos alvos apropriados, as MASPs tornam-se ativadas a partir de pró-enzimas (zimogênicos) e catalisam a clivagem de C4 e C2, para gerar C3 convertase (C4bC2a), desencadeando a cascata de ativação do complemento (FIGURA 3) (Beltrame, Catarino et al. 2015). Para dar início a cascata da VL é necessário que MASP-1 clive MASP-2, a qual é estruturalmente homóloga às proteases C1r e C1s da VC, responsáveis por clivar C2 e C4, nesse momento as vias clássica e das lectinas assumem o mesmo curso de ativação do complemento. MASP-3 quando em alta concentração, compete com MASP-1 e MASP-2 e se liga à MBL inibindo a VL, por outro lado, concentrações menores de MASP-3 ativa o pró-fator D em fator D, dando seguimento a VA. O papel da VL de compartilhar do mesmo caminho tanto da VC quanto da VA ressalta a sua importância na fisiopatologia do LES (Medjeral-Thomas, Troidborg et al. 2018).

Nesse contexto, estudos recentes mostram que o complemento exerce um papel duplo na progressão do LES, apresentando tanto uma função protetora como patogênica, devido a um balanço entre o seu papel na remoção de complexos imunes e células apoptóticas e o seu papel na inflamação. A via clássica, embora envolvida no dano tecidual iniciado por autoanticorpos, contribui benéficamente no *clearance* dos IC e células apoptóticas, enquanto a via alternativa é considerada o mediador chave da inflamação e um forte mecanismo de patogenicidade, em especial na nefrite lúpica, já a importância da via das lectinas se dá principalmente por ser ativada na ausência de anticorpos e por suas proteínas iniciadoras agirem ativando ou inibindo tanto a VC quanto a VA. Dessa forma, o estudo do SC no LES pode contribuir para melhor esclarecimento da fisiopatologia da doença, além de ser considerado um alvo terapêutico em potencial, já que é reconhecido

como mediador central da inflamação (Lee and Werth 2012, Lins and Santiago 2015, Macedo and Isaac 2016).

FIGURA 3 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO



FONTE: Beltrame et al., 2015.

LEGENDA: MAC (complexo ataque a membrana); MBL (lectina ligante de manose); MASP (serina- proteases associadas às MBL); CL-K1 = coletina renal 1; CL-L1 = coletina hepática 1; Poli-C9 = polímero de C9; P = properdina. NOTA: Via terminal = etapa final da ativação do complemento com formação do MAC e levando à lise osmótica do patógeno.

3.2.2 Família dos receptores de complemento

São descritos quatro receptores de complemento: CR1 (também conhecido como grupo de diferenciação 35 ou CD35, ou ainda, receptor de C3b/C4b), CR2 (CD21), CR3 (CD11b/CD18) e CR4 (CD11c/CD18). CR1 e CR2 são expressos principalmente em células B e células dendríticas foliculares, enquanto CR3 e CR4 são integrinas expressas nos macrófagos e células dendríticas (Abbas, Gorial et al. 2019, Angel, Vaillant; et al. 2019). Um quinto receptor de complemento, CR1g, foi descrito em 2006 (FIGURA 4).

CR1 é uma glicoproteína de cadeia simples ligada à membrana, que atua como principal regulador da ativação do sistema complemento (Dykman, Cole et al. 1983, Wong, Wilson et al. 1983, Dykman, Hatch et al. 1984). Além das células B e células dendríticas foliculares anteriormente mencionadas, CR1 também é expresso em eritrócitos, monócitos, neutrófilos, algumas células T e podócitos glomerulares. A estrutura de CR1 consiste em uma série linear de módulos de curtas repetições de consenso (SCR) estruturalmente relacionados, seguido por um curto domínio transmembranar e intracitoplasmático, o que o coloca na família de proteínas reguladoras de ativação do complemento (RCA).

Polimorfismos de CR1 que alteram a expressão do gene ou a atividade da proteína são comuns em diferentes populações e têm sido associados a diferentes doenças infecciosas, como hanseníase e malária, autoimunes, como LES e artrite reumatoide, e neurodegenerativas, como Alzheimer (Arora, Grover et al. 2011, Kremlitzka, Polgár et al. 2012, Lord and Morgan 2013). O CR1 atua como receptor para C3b e C4b, regulando a cascata de ativação do sistema complemento e removendo complexos imunes opsonizados, da circulação sanguínea, exercendo assim atividade anti-inflamatória (Bennet, Sundberg et al. 2000, Arumugam, Magnus et al. 2006, Li, Yang et al. 2010). Estudos demonstram que no LES baixa expressão de CR1 e polimorfismos no gene, contribui para o acúmulo e deposição de IC, provocando danos nos tecidos ou a agregação celular (Arora, Verma et al. 2004).

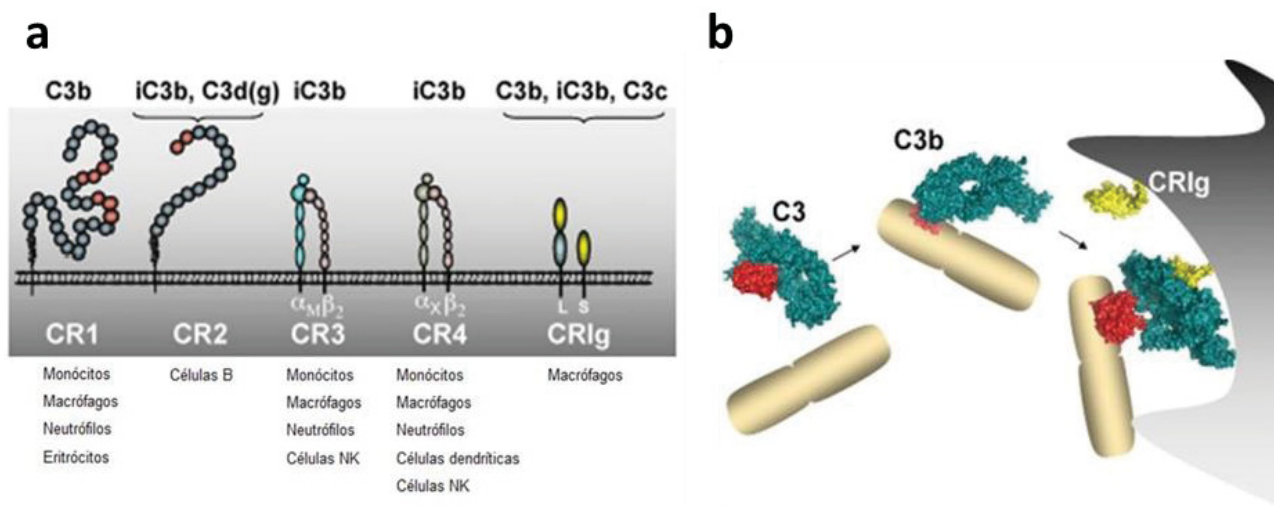
CR2 também é expresso em linfócitos B maduros, um pequeno subconjunto de células T periféricas, timócitos precoces, basófilos, mastócitos, queratinócitos e outros tipos de células epiteliais (Lee and Werth 2012, Macedo and Isaac 2016, Pacheco, Barahona-Correa et al. 2017).

CR3 e CR4 são membros da família das integrinas e compartilham cadeias β comuns da forma $\beta 2$. Eles são expressos em células fagocíticas profissionais, tais como neutrófilos, monócitos e macrófagos, um subconjunto de linfócitos e eosinófilos. CR3 é uma molécula multifuncional e possui funções independentes do complemento na adesão celular, ao interagir com uma variedade de ligantes, incluindo ICAM-1, fator X e fibrinogênio. CR3 e CR4 podem mediar a fagocitose de antígenos iC3b-opsonizados para células apresentadoras de antígenos, podendo aumentar a apresentação do antígeno (Lin, Seshasayee et al. 2015, Macedo and Isaac 2016, Sawada, Fujimori et al. 2019).

CR1g é expresso exclusivamente em macrófagos residentes em tecido e macrófagos sinusoidais, sua estrutura e função são conservados em humanos e camundongos.

Diferente dos outros receptores de complemento, CR1g é encontrado em associação com a reciclagem constitutiva de vesículas de membrana e participa na internalização de partículas C3-opsonizadas por KCs (células de Kupffer). CR1g é considerado um componente crítico do sistema imune inato (Alegretti 2011) (Abbas, Gorial et al.)

FIGURA 4 - (A) RECEPTORES DO SISTEMA COMPLEMENTO E (B) OPSONIZAÇÃO MEDIADA POR C3B COM RECONHECIMENTO POR CR1G



FONTE: Adaptado de Chung; Park (2008).

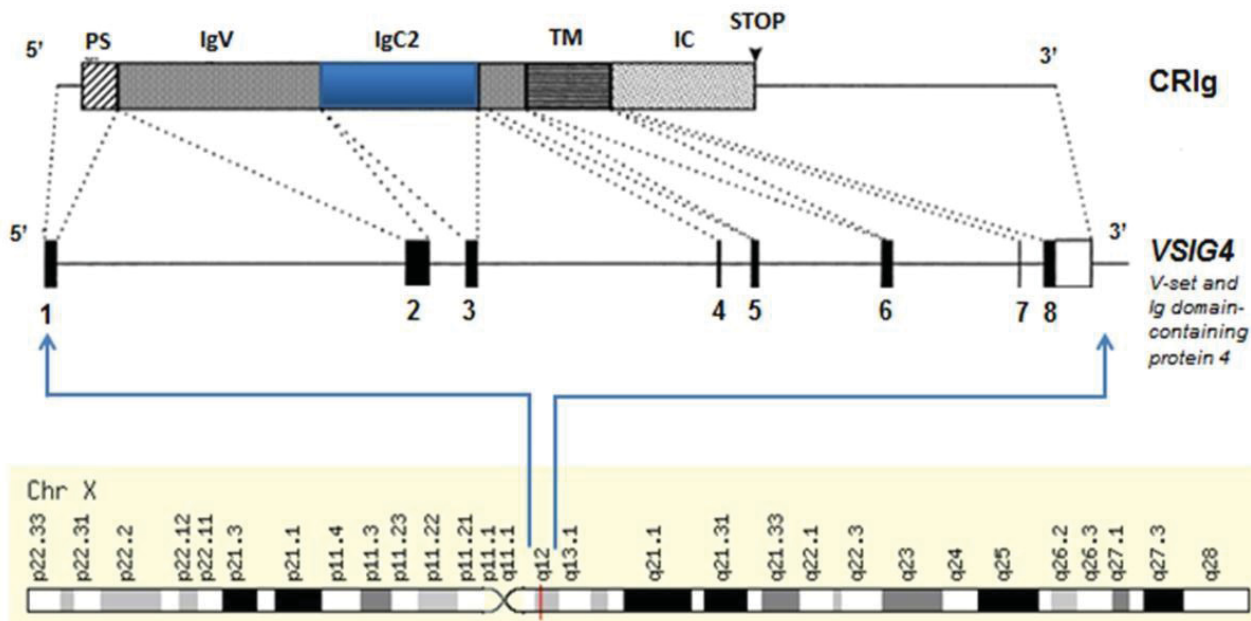
LEGENDA: C3b, iC3b, C3d(g), C3c = fragmentos da proteína C3; CR1, CR2, CR3, CR4 = receptores de complemento 1 a 4; CR1g = receptor de complemento da superfamília das imunoglobulinas.

3.2.3 CR1g

O último receptor de complemento descrito pertence a superfamília das imunoglobulinas (CR1g) (Helmy, Katschke Jr et al. 2006). CR1g é uma proteína transmembrana presente nos macrófagos, que reconhece os fragmentos C3b, iC3b e C3c do complemento (Wiesmann, Katschke et al. 2006). A proteína CR1g é codificada pelo gene *VSIG4* (*V-set and Ig domain containing protein 4*), inicialmente denominado *Z39IG*, o qual está localizado na região pericentromérica do cromossomo X humano (Xq12), com 18.3 Kb e 8 exons (Langnaese, Colleaux et al. 2000). O exon 1 tem 117-182 pb e codifica o peptídeo sinal; o exon 2 tem 357 pb e codifica o domínio extracelular de Ig do tipo V (IgV); o exon 3 alternativo tem 282 pb e codifica o domínio extracelular de Ig do tipo C2 (IgC2); os exons 4 e 5 têm 63 pb e 78 pb, respectivamente, e codificam a região estrutural extracelular; o exon 6 tem 105 pb e codifica para a região transmembranar; e os exons 7 e 8, têm 22 pb e 732-763 pb, respectivamente, e codificam a região intracelular. Estes dois últimos podem ser

reunidos num só exon em uma das isoformas, contendo 1123 pb ao total (FIGURA 5) (Langnaese, Colleaux et al. 2000).

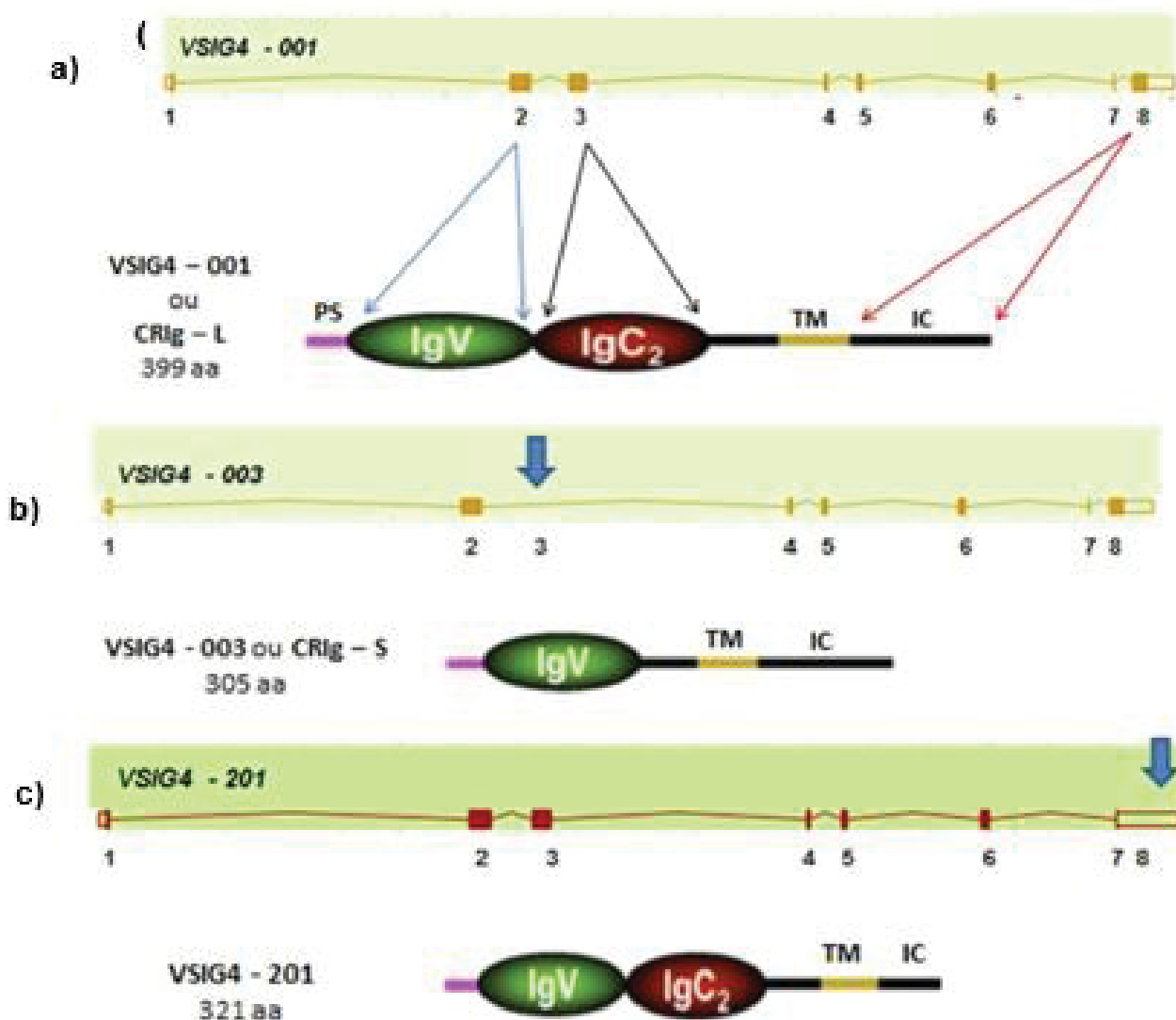
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA E LOCALIZAÇÃO DO GENE *VSIG4* NO CROMOSSOMO X



FONTE: Adaptado de Langnaese et al., (2000).

LEGENDA: PS= peptídeo sinal; IgV – domínio extracelular de Ig tipo V; IgC2= domínio extracelular de Ig tipo C2; TM – região transmembranar; IC = região intracelular; Chr X= cromossomo X.

Helmy et al. (2006) clonaram duas variantes do gene *VSIG4*, uma forma longa idêntica ao Z39Ig, que codifica uma proteína com 399 aa, com os domínios extracelulares IgV e IgC2, denominada CRlg(L) ou *VSIG4-001*, e uma forma curta que não possui o exon alternativo 3 e codifica uma proteína com 305 aa, com um único domínio extracelular IgV, denominada CRlg(S) ou *VSIG4-003*. As formas longa (IgV e IgC2) e curta (IgV) da proteína CRlg estão presentes em humanos, enquanto camundongos expressam apenas a forma IgV. Os dados mostram que o domínio do tipo V da proteína CRlg é essencial para a sua capacidade de ligar componentes do complemento (fragmentos de C3) e promover a fagocitose, enquanto o significado do domínio do tipo C2 permanece incerto. (Helmy, Katschke Jr et al. 2006). Posteriormente, foi descrita uma variante denominada *VSIG4-201*, que difere na região 3' UTR e na região codificadora 3', comparada com a variante *VSIG4-001*. A variante *VSIG4-201* se caracteriza pela não tradução do exon 8, o que resulta na síntese de uma isoforma de CRlg com 321 aa com uma região C-terminal mais curta em relação à isoforma *VSIG4-001* (FIGURA 6) (Stinghen 2015).

FIGURA 6 - TRANSCRITOS DO GENE *VSIG4* E ISOFORMAS (a) *VSIG4 001*, (b) *VSIG4-003* e (c)

Fonte: Adaptado de Helmy et al., (2006).

NOTA: *VSIG4 - 001*: variante contendo 8 exons, codifica a isoforma CRlg(L) com 399 aa; *VSIG4 - 003* = ausência do exon 3 alternativo (seta azul), codifica a isoforma CRlg(S) com 305 aa; *VSIG4 - 201* = codifica uma proteína com 321 aa devido a uma cadeia polipeptídica com a região C-terminal mais curta (exon 8 não traduzido, seta azul).

LEGENDA: PS= peptídeo sinal; IgV – domínio extracelular de imunoglobulina (Ig) tipo V; IgC₂= domínio extracelular de Ig tipo C2; TM – região transmembranar; IC = região intracelular.

CRlg é expresso em altas concentrações em macrófagos do fígado (células de Kupfer - KC), células dendríticas, macrófagos residentes em vários tecidos. Em humanos a proteína CRlg também foi detectada em macrófagos sinoviais, alveolares, da glândula adrenal, coração, baço, células de Hofbauer e histiócitos da lâmina própria (HELMY et al., 2006). O gene *VSIG4* é expresso em diversos tecidos. As concentrações mais elevadas de RNA mensageiro (mRNA) foram encontradas no tecido adiposo, pulmão, baço, artérias

adrenal e aorta, glândula adrenal esôfago, intestino delgado, nervo torácico, bexiga, cólon e sangue total (Lonsdale, Thomas et al. 2013). A isoforma *VSIG4-001* é a variante expressa em maior quantidade na maioria dos tecidos, como o tecido adiposo, pulmão, baço, pele e nervo tibial (Lonsdale, Thomas et al. 2013).

A rápida captura dos patógenos pelo fígado é crucial para evitar bacteremia sistêmica e envolve mecanismos da imunidade inata e adaptativa (Roosendaal and Carroll 2006). CR1g contribui para a eliminação de patógenos nos estágios iniciais da infecção através da captura dos patógenos pelas KCs. Isso foi observado em experimentos realizados com camundongos deficientes em CR1g que demonstrou importante depuração de bactéria intracelular por macrófagos presentes nas células de Kupffer do fígado, impedindo a disseminação das bactérias para outros órgãos. Esta proteção oferecida por CR1g foi evidenciada pela redução em número de bactérias e um aumento na sobrevivência do animal. Resultados semelhantes foram obtidos quando o patógeno extracelular *Staphylococcus aureus* foi analisado, levando à conclusão de que o CR1g é necessário para a rápida depuração de bactérias intracelulares e extracelulares através de opsonização por C3 (Helmy, Katschke Jr et al. 2006). Entretanto, CR1g é um receptor de complemento não somente para patógenos opsonizados, mas também para células autólogas opsonizadas, sugerindo uma via potencial na prevenção da autoimunidade sistêmica. Estudos em camundongos demonstraram que CR1g participa na eliminação de plaquetas opsonizadas com complemento (Kim, Bang et al. 2016).

Mediadores inflamatórios exercem seus efeitos sobre macrófagos regulando a expressão de CR1g. Dessa forma, as citocinas são capazes de alterar a expressão de CR1g em macrófagos humanos (Gorgani, Thathaisong et al. 2011). Ao presenciar macrófagos teciduais CR1g+, sugere-se homeostasia e redução do quadro inflamatório (Ma, Usuwanthim et al. 2015)

Campagne et al. (2007) através de experimentos em modelos animais, conseguiram provar não só a importância do CR1g na defesa do organismo contra infecções e promoção da fagocitose, como também descobriram a propriedade desta proteína de interagir de forma única com a VA ao inibir sua ativação, isso foi demonstrado em experimentos com modelo murino que apresentava doença inflamatória (van Lookeren Campagne, Wiesmann et al. 2007, Small, Al-Baghdadi et al. 2016). Em publicação paralela, Vogt e colaboradores (2006), também demonstraram atividade imunossupressora de CR1g *in vitro* e em camundongos. Esse domínio extracelular IgV de CR1g por ser um potente inibidor das

convertases da via alternativa (VA) do SC, indicando um potencial uso terapêutico deste receptor (Vogt, Schmitz et al. 2006).

Experimentos em modelos animais com artrite utilizando CR1g na forma solúvel (CR1g-Fc), demonstraram que era possível reverter a inflamação e a perda óssea em dois modelos experimentais de artrite. Ao inibir a VA do complemento com a proteína solúvel, o estudo demonstrou que a VA é essencial para a indução e progressão da doença (Katschke, Helmy et al. 2007). A participação de CR1g também foi investigada em um estudo em que a proteína foi administrada em camundongos MRL / lpr com lúpus (Lieberman, Mizui et al. 2015). O grupo relatou diminuição da inflamação cutânea e renal, e diminuição da proteinúria e piúria em camundongos que receberam CR1g-Fc. Outro estudo, utilizando modelo animal com artrite induzida, sugeriu que a via alternativa não é apenas importante na indução da doença, mas também na progressão desta e que o domínio extracelular de CR1g pode ser considerado uma nova ferramenta para estudar os efeitos de inibição da VA na doença já estabelecida, constituindo uma terapêutica promissora com seletividade para um único caminho do complemento (Gorgani, Thathaisong et al. 2011)

Curiosamente, em 2010 descobriu-se que as células dendríticas humanas que expressam CR1g suprimem a proliferação de células T, expressão de marcadores de atividade (CD25 e CD69) e produção de citocinas (Th1), sugerindo que o CR1g⁺ em células dendríticas podem promover tolerância e imunossupressão (Xu, Sun et al. 2010). Outro estudo analisou a expressão da proteína CR1g em animais com tumor pulmonar e perceberam que em baixa concentração de CR1g, o tamanho do tumor era significativamente menor quando comparado ao grupo controle (Liao, 2014). Estes achados sugerem que CR1g pode ter um papel na regulação da malignidade e possivelmente ser utilizado como uma estratégia eficaz para o tratamento deste tipo de carcinoma (Van Loo, Tousseyn et al. 2010, Liao, Guo et al. 2014, Small, Al-Baghdadi et al. 2016).

Estudos envolvendo a proteína e o gene *VSIG4* ainda são raros, porém demonstram relação com manifestação de doenças, inclusive autoimunes. Tais aspectos corroboram na importância e relevância da investigação de polimorfismos no gene *VSIG4*, possibilitando melhor compreensão da fisiopatologia do LES.

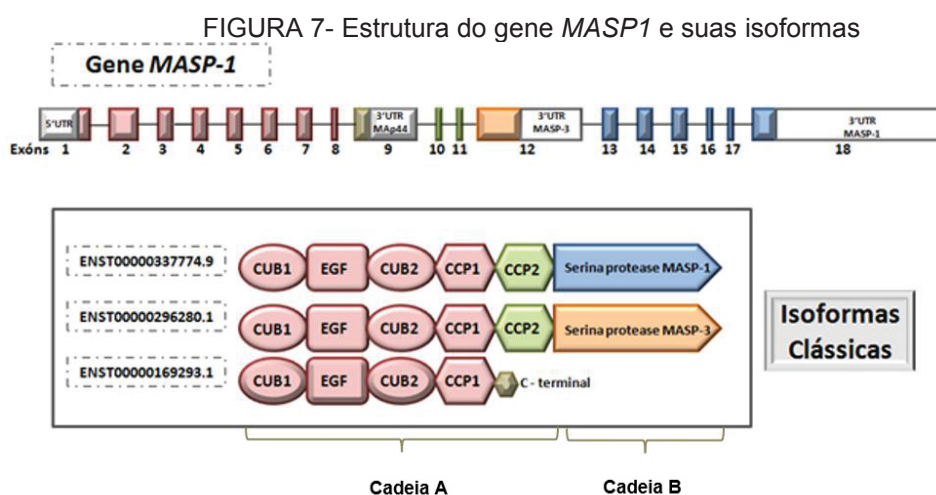
3.3 MASP-1

3.3.1 Gene *MASP1*

O gene *MASP1* contém 18 exons , está localizado no cromossomo 3q27-q28, abrangendo 76 kb e codifica para a formação de 3 proteínas MASPs produtos de splicing alternativos: MASP-1, MASP-3 e MAp44 (Andrade, Lidani et al. 2017).

As três enzimas MASPs têm uma organização de domínio idêntica, que também é semelhante à das duas serinas proteases da via clássica, C1r e C1s. O domínio regulatório (cadeia A) é composto por C1r / C1s, Uegf e proteína morfogenética óssea 1 (CUB1), seguido pelo fator de crescimento epidérmico (EGF), um segundo domínio CUB (CUB2) e dois complementos contíguos, proteínas de controle (CCPs) 1 e 2 (Andrade, Lidani et al. 2017).

O domínio regulador é responsável pela dimerização das MASP e pela ligação às PRMs (moléculas de reconhecimento padrão) e é seguido pelo módulo com a atividade catalítica (cadeia B), o domínio da serina protease (SP). Os domínios CCP2 e SP são conectados através de um peptídeo ligante (também denominado peptídeo de ativação), onde uma ligação Arg-Ile é clivada por autólise quando complexos MASP / PRR se ligam a patógenos, ligando as cadeias A e B através de uma ligação dissulfeto (Figura 7) (Sato, Endo et al. 1994, Thielens, Enrie et al. 1999, Gregory, Thielens et al. 2004, Kjaer, Thiel et al. 2013).



Fonte: O autor (2019).

LEGENDA: As cores dos exons no gene e dos domínios da proteína são correspondentes. CUB1: C1r/C1s, Uefg, proteína osso morfogenética; EFG: Fator de crescimento epidermal; CCPs: proteínas de controle do complemento contíguo; UTR: Região não traduzida.

Estudo realizado em população saudável na Dinamarca, demonstrou que alguns polimorfismos do gene *MASP1* estão associados aos níveis séricos de MASP-1, MASP-3 e MAp44. Neste estudo, observou-se que heterozigotos de rs190590338 (G > A) conduziram a um aumento na concentração média de MASP-1, enquanto o alelo menor de rs7625133 (A > C) diminuiu a concentração de MAp44. Os alelos menores dos SNPs rs3774275 (A > G), rs698090 (T > C) e rs67143992 (G > A) resultam em um aumento de MASP-1 e MAp44 e uma diminuição nas concentrações séricas de MASP-3. Os SNPs rs72549154 (G > T) e rs35089177 (T > A) mostraram o efeito oposto, os alelos menores resultaram em um aumento de MASP-3 e uma diminuição de MASP-1 e MAp44 (Ammitzbøll, Steffensen et al. 2013).

Em pacientes com fibrose cística homozigotos (A / A) e alelos heterozigotos (G / A), para o SNP rs850312 (G > A) foi associado ao início mais precoce da colonização por *Pseudomonas aeruginosa* (Haerynck, Van Steen et al. 2012). Um polimorfismo não sinônimo (rs38343199) no exon 10 (G > A) localizado no domínio MASP-1 e MASP-3 CCP2 foi avaliado no lúpus eritematoso sistêmico (LES), na síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) e / ou pacientes com sepsis. No entanto, nenhuma associação foi encontrada entre esta substituição de aminoácidos e as doenças (Weiss, Madsen et al. 2007). Algumas mutações no gene *MASP-1* também estão relacionadas à síndrome 3MC (Malpuech-Michels-Mingarelli-Carnevale) autossômica recessiva. Essa síndrome é caracterizada por um espectro de anomalias no desenvolvimento que incluem dismorfia facial como presença de olhos espaçados (hipertelorismo), estreitamento da abertura

ocular (blefarofimose), pálpebras caídas (ptose), sobrancelhas altamente arqueadas e uma abertura no lábio superior (fenda labial) com um abertura no céu da boca (fenda palatina), além de atraso no desenvolvimento, deficiência intelectual, perda auditiva e crescimento lento após o nascimento, resultando em baixa estatura (Atik, Koparir et al. 2015).

Tais estudos, mesmo não encontrando correlação direta dos SNPs analisados com o LES, justificam a importância do estudo de outros polimorfismos do gene *MASP-1*, visto que suas proteínas MASP-1 e MASP-3 atuam diretamente na Via das Lectinas (VL) do SC e apresentam importante correlação com processos inflamatórios.

3.3.2 PROTEINA MASP-1

A MASP-1 foi caracterizada por Matsushita e Fujita (1992) como a primeira serina protease do tipo C1s e foi associada a MBL. Esta serina protease desempenha um papel central no início da VL, realizando a ativação de MASP-2 e formando complexos com moléculas de reconhecimento padrão (PRMs) da VL: MBL, ficolinas e colectinas, que se ligam a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e/ou padrões moleculares associados a dano celular (DAMPs) e então ativam a cascata do complemento (Andrade, Lidani et al. 2017).

Sua concentração é 20 vezes maior que MASP-2 no plasma. A MASP-1 sofre auto-ativação e em seguida ativa a MASP-2 que atua de maneira análoga à de C1r e C1s na VC, sendo responsável por 60% da formação da clivagem de C2 e C3 convertase [52, 53]. Apesar da auto-ativação de MASP-1 controlar o início da VL, não cliva C4, ou seja, não é capaz de gerar C3 convertase por si só, embora a ativação direta de C3 por MASP-1 possa ocorrer com uma eficiência relativamente baixa (Ambrus, Gál et al. 2003, Yongqing, Drentin et al. 2012).

A MASP-1 é imediatamente ativada após infecção microbiana pela ligação de complexos PRM a alvos que levam à opsonização, lise celular, liberação de anafilotoxinas, quimiotaxia de neutrófilos e inflamação. De fato, os níveis plasmáticos de MASP-1 têm sido associados a alguns distúrbios inflamatórios, e a atividade do complexo MBL / MASP-1 tem sido associada à gravidade da doença na glomerulonefrite aguda pós-estreptocócica e ao vírus da hepatite C (HCV), levando a deposição glomerular de fibrinogênio e hematuria, (Hisano, Matsushita et al. 2007) e fibrose hepática (Brown, Ryder et al. 2007), respectivamente. Além disso, os níveis plasmáticos de MASP-1 também foram maiores em

pacientes que sofreram infarto do miocárdio e naqueles que apresentam diabetes mellitus tipo 1 (Frauenknecht, Thiel et al. 2013). Já nas doenças autoimunes, níveis plasmáticos elevados de MASP-1 estão associados ao LES (Trolborg, Thiel et al. 2015).

MASP-1 é expressa principalmente no fígado, com níveis plasmáticos médios de 11 µg / ml (variação de 4-30 µg/mL) (Thiel, Jensen et al. 2012) e contribui significativamente para o desenvolvimento da reação inflamatória por atividade proteolítica. Essa proteína induz vias de sinalização de Ca²⁺, NF-κB e p38 MAPK em células endoteliais através do receptor 4 ativado por protease (PAR4) e essa atividade leva à liberação de IL-6 e IL-8, ativando a quimiotaxia de neutrófilos (Jani, Kajdacs et al. 2014). A MASP-1 também é capaz de modular a resposta imune pela liberação de bradicinina pró-inflamatória de cininogênio de alto peso molecular (Dobó, Major et al. 2011).

Também possui atividade pró-coagulante, cliva e ativa o Fator XII e o fibrinopeptídeo, atuando na atração de neutrófilos para a cascata de coagulação (Krarup, Wallis et al. 2007). Também ativa carboxipeptidase B2, uma molécula que previne a fibrinólise e inativa as anafilatoxinas C3a e C5a (Hess, Ajjan et al. 2012).

3.3.3 PROTEÍNA MASP-3

O MASP-3 é um produto alternativo do gene *MASP1*, que contém uma cadeia A idêntica, mas uma cadeia B completamente diferente e é altamente conservada (Stover, Lynch et al. 2003) (figura 7). A MASP-3 é expressa principalmente no pâncreas, músculo esquelético, baço, timo, próstata e ovário (Yongqing, Drentin et al. 2012). A concentração sérica média é de 5,2 µg / ml (variação de 1,8 a 10,6 µg / ml), ocorrendo principalmente em associação com ficolina-3 e em menor quantidade com ficolina-2 e MBL (Skjoedt, Palarasah et al. 2010, Degn, Jensenius et al. 2011).

Estudos demonstraram que os níveis de MASP-3 foram associados a infecções em crianças admitidas na unidade de terapia intensiva (UTI). Baixa concentração de MASP-3 foi associado a um aumento do risco de adquirir novas infecções em crianças gravemente doentes (Ingels, Vanhorebeek et al. 2014).

Juntamente com CL-K1, MASP-1 e MAp44, o MASP-3 parece ter um papel importante no desenvolvimento embrionário inicial, como mostrado pelo efeito de algumas mutações raras em uma região altamente conservada do exon 12 do gene *MASP1*, que é exclusivo da MASP-3 e causa a síndrome 3MC (Malpuech-Michels-Mingarelli-Carnevale),

caracterizada por vários distúrbios do desenvolvimento (Sirmaci, Walsh et al. 2010, Rooryck, Diaz-Font et al. 2011).

Esta proteína também possui capacidade de clivar a proteína 5 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP-5), a proteína IGFBP-5 possui papel crucial no controle de sobrevivência de uma célula, diferenciação celular e apoptose (Cortesio and Jiang 2006). Diferente de MASP-1, MASP-3 não é capaz de se ligar aos PRMs da VL, e atua inibindo a ativação da VL ao competir com MASP-1 e MASP-2 por sítios de ligação em colectinas ou ficolinas, mas circula no soro principalmente associado à FCN-3 (ficolina-3) (Skjoedt, Hummelshoj et al. 2010). MASP-3 cliva exclusivamente o pró-fator D da via alternativa (VA), e o fator D cliva o fator B complexado com C3b, criando a enzima C3 convertase da via alternativa.

Medjeral-Thomas e colaboradores (2018), consideram que o mecanismo que provoca o aumento da inflamação glomerular no caso da IgAN, uma doença na qual a glomerulonefrite é causada por depósito de anticorpo (imunoglobulina A), provocando inflamação e lesão dos glomérulos de forma progressiva, seja o mesmo no caso do aumento da inflamação renal na nefrite lúpica, sugerindo maior ativação SC nos rins. A proteína MASP-3 tem a capacidade de deslocar por competição MASP-1 e 2 e ligar-se aos seus sítios de ativação, inibindo a via das lectinas, porém, baixas concentrações de MASP-3 estão associadas ao aumento da ativação do complemento. Segundo o autor, quando em baixas concentrações, MASP-3 não se liga aos sítios de MASP1 e 2 e sua função é direcionada para ativar o fator D, desencadeando a via alternativa e intensificando o processo inflamatório na nefrite lúpica. Esse estudo é de grande importância pois demonstra que a VL está intimamente relacionada a VA e a VC, entretanto se a ativação glomerular pela via alternativa na nefrite lúpica ou na IgAN é influenciada diretamente pelos níveis de MASP-3, ainda não foi comprovado.

3.3.4 PROTEÍNA MAp44

MAp44 é uma proteína que não apresenta o domínio SP, conseqüentemente não tem atividade funcional. Essa proteína é expressa principalmente no músculo cardíaco e esquelético, com concentração sérica média de 1,7 µg / ml (Skjoedt, Palarasah et al. 2010, Degn, Jensenius et al. 2011).

Embora o MAp44 não contenha o domínio SP, os outros domínios interagem com MBL ou ficolinas, competindo com MASP-1, MASP-2 e MASP-3 e resultando na inibição da deposição de C4 e conseqüentemente na inibição da ativação do complemento (Fraser, Koziel et al. 1998) .

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de Seres Humanos da Universidade Evangélica do Paraná (Nº do CAAF 58740316.6.0000.0103, projeto “Proteínas e genes a resposta imune inata em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico”) (ANEXO 3) em parceria com o Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Trata-se de um estudo observacional transversal.

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 PACIENTES

Faz parte do estudo um total de 179 pacientes atendidos no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Evangélico de Curitiba, cujas amostras de sangue foram coletadas entre os períodos de agosto de 2011 a março de 2012 e fevereiro de 2016 a julho de 2016.

Atualmente o referido Ambulatório possui aproximadamente 400 pacientes registrados com LES e destes, 300 permanecem ativos comparecendo às consultas. As consultas acontecem todas as terças feiras no período da manhã e cerca de 30 pessoas são atendidas por semana. Os pacientes foram informados e esclarecidos sobre o projeto e aqueles que concordaram em participar, após consentimento formal (Anexo 4), tiveram sua amostra de sangue coletada.

Os pacientes com LES foram selecionados consecutivamente frente aos seguintes critérios de inclusão: o paciente deveria atender ao menos 4 dos 11 critérios diagnósticos estabelecidos pelo *American College of Rheumatology* e deveria ser maior de 18 anos (Hochberg 1997).

A caracterização das amostras dos pacientes foi determinada e devidamente registrada com base na análise de seu histórico clínico, o qual foi levantado através de

consulta ao questionário epidemiológico utilizado pelo ambulatório, e através dos prontuários médicos dos pacientes. Visando a avaliação de possíveis associações clínicas foram analisados dados referentes a epidemiologia (sexo, idade, etnia auto declarada, idade de início da doença e duração da doença), perfil clínico e sorológico, atividade da doença presente no momento da consulta de acordo com o questionário SLEDAI (Gladman, Ibanez et al. 2002) e o perfil (dano ocular, neuropsiquiátrico, renal, pulmonar, cardiovascular, vascular periférico, gastrointestinal, musculoesquelético, pele, gônadas, endócrino e neoplasias) e escore do dano cumulativo avaliado através do SLICC/ACR-DI (Anexo 1).

4.1.2 GRUPO CONTROLE

O grupo controle constituiu-se de adultos voluntários sadios que foram selecionados entre os doadores do Hemepar (Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná) e do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas, que declararam através de questionário não possuir DAI e nem apresentar familiares com diagnóstico para DAI. Foram selecionadas 156 amostras de DNA de controles que foram pareados em idade, sexo e ancestralidade com o grupo de análise. Estes controles foram utilizados para estimar as frequências dos SNPs na população saudável de Curitiba e Região Metropolitana (Tabela 4 e 7).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As coletas foram realizadas no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Evangélico de Curitiba após explanação sobre a pesquisa, esclarecimento de dúvidas e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo 4). As amostras foram obtidas pela coleta de 5 mL de sangue venoso periférico em um tubo com anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA) e 5 mL em um tubo sem anticoagulante. Após coleta, o material foi transportado sob refrigeração até o Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, onde os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3.500 rpm (Centrífuga Eppendorf 5416, Hamburgo, Alemanha). As amostras coletadas sem anticoagulantes foram divididas em três alíquotas de soro,

identificadas e armazenadas em freezer a - 80°C. As amostras coletadas com EDTA foram separadas em três alíquotas de plasma e uma alíquota da camada leuco-plaquetária (buffy-coat), identificadas e armazenadas em freezer a -80°C.

4.2.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Para extração de DNA genômico de cerca de 30% das amostras utilizou-se um kit comercial (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com instruções do fabricante. O restante das amostras, equivalente a 70%, tiveram o DNA genômico extraído da camada leuco-plaquetária pela técnica “salting-out” (Anexo 5) presente no Laboratório de Imunopatologia Molecular do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Em ambas as técnicas, os procedimentos compreenderam etapas de lise de células, precipitação de proteínas, precipitação e ressuspensão do DNA.

4.2.3 ANÁLISE DE POLIMORFISMOS POR PCR-SSP

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica relativamente simples, altamente sensível e permite a rápida amplificação *in vitro* de um segmento específico de DNA. São produzidas bilhões de cópias de um fragmento específico de DNA. A reação é realizada em sucessivos ciclos de desnaturação da dupla fita de DNA, anelamento e extensão de oligonucleotídeos específicos (iniciadores) pela ação da enzima Taq DNA polimerase (DOES 2013).

No método de PCR sequência específica (PCR-SSP) são utilizados iniciadores que consistem de 18 a 25 nucleotídeos desenvolvidos para que o último nucleotídeo (3') seja complementar aos nucleotídeos variantes de interesse da fita- molde. A genotipagem SSP baseia-se na premissa de que, se não houver complementaridade perfeita entre o último nucleotídeo do iniciador e a fita-molde, não há amplificação da sequência desejada, permitindo a genotipagem dos SNPs do gene candidato *VSIG4* na população estudada.

Para análise dos SNPs selecionados para o gene MASP1, utilizou-se a técnica de genotipagem PCR-SSP multiplex, pois permite identificar , simultaneamente vários fragmentos de DNA (em geral, mais de dois) e possibilita gastar menos amostra de DNA, tempo, material e reagentes de PCR. A técnica de PCR multiplex foi realizada utilizando mistura de três ou mais iniciadores com especificidades diferentes e com temperaturas de

anelamento similares, projetados para amplificar fragmentos separáveis em gel de agarose (diferença de 100 pares de base aproximadamente).

4.3 PCR-SSP DO GENE *VSIG4*

A técnica de PCR-SSP foi associada com a PCR *touchdown* para aumentar a especificidade e a sensibilidade, otimizando a reação. A PCR *touchdown* consiste em reduzir a temperatura de anelamento entre os ciclos da PCR partindo de uma temperatura acima da temperatura de pareamento calculada para os iniciadores ($T_{melting}$ ou T_m) (Korbie and Mattick 2008). Nesse estudo foram analisados seis SNPs do gene *VSIG4* (Tabela 1).

TABELA 1 - SEQUÊNCIA DOS INICIADORES PARA GENOTIPAGEM DO GENE *VSIG4*

Nº	Região	Posição	SNP	Direção	Iniciador	Fragmento (pb)
1	Promotor	g.66041429	rs2284705	Fwd	5'-TGG TGT AGT GGT GAT AGG GTG T-3'	792
2					5'-TGG TGT AGT GGT GAT AGG GTG A-3'	
3		g.66040683	rs5964489	Rev	5'-TCA CTT TCT ACA ATG GCT CCA CCT C-3'	
4					5'-TCA CTT TCT ACA ATG GCT CCA CCT G-3'	
5	Intron 1	g.66033927	rs5964488	Fwd	5'-GTG ATA GAA AGA AAG TTG AGT GGC A-3'	412
6					5'-GTG ATA GAA AGA AAG TTG AGT GGC G-3'	
7	Exon 2	g.66033564	rs34581041	Rev	5'-TGA CTT CAC ACG TGT AGT GGC TCC G-3'	
8					5'-TGA CTT CAC ACG TGT AGT GGC TCC A-3'	
9	Intron 3	g.66029762	rs5964487	Fwd	5'-CCT CAA ACC TGT TAG AAA ACA T-3'	768
10					5'-CCT CAA ACC TGT TAG AAA ACA C-3'	
11		g.66029097	rs9887348	Rev	5'-GAC ATG AGA AAA CCA TAA GCT C-3'	
12					5'-GAC ATG AGA AAA CCA TAA GCT T-3'	

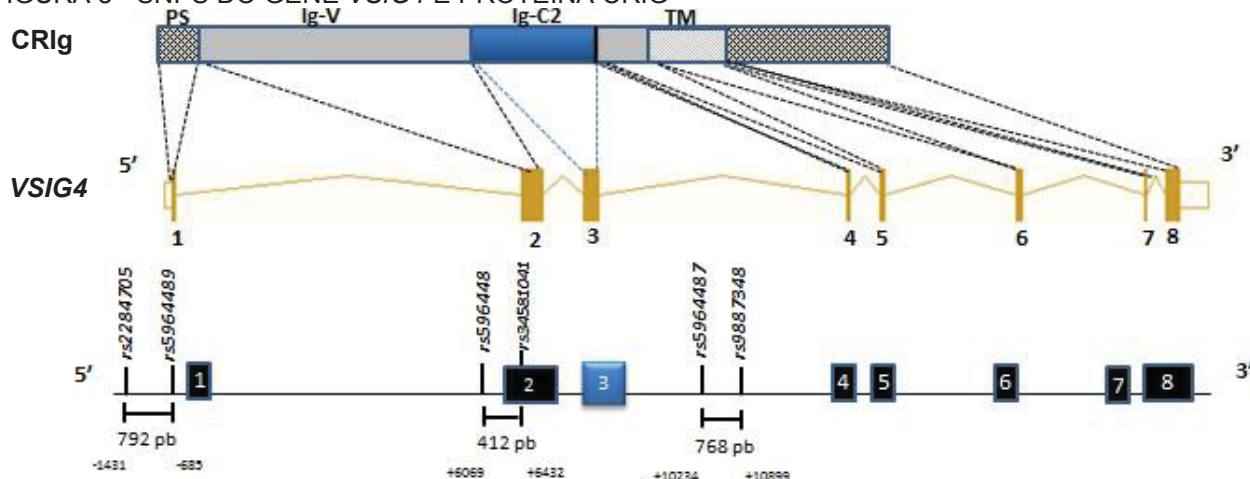
NOTA: fwd = direto; rev = reverso; A = adenina; T = timina; C = citosina; G = guanina; pb = pares de base.

O gene *VSIG4* é altamente conservado e por essa razão, selecionou-se SNPs em regiões não codificadoras, não tão conservadas. Dentre estes, selecionamos SNPs que possivelmente alteram regulação da expressão gênica, no promotor. Os dois SNPs selecionados foram o *rs2284705*, comum na população europeia (A = 100%) e o *rs5964489*

que apresenta C = 89% e C = 11% na mesma população. Também selecionou-se SNPs intrônicos comuns na população europeia (intron 1 com *rs5964488*, T = 89% e c = 11% e intron 3 com o polimorfismo *rs5964487*, A = 89% e G = 11%, e *rs9887348*, T = 89% e C = 11%), que possivelmente interferem no processamento alternativo do exon 3 no pré-mRNA, modulando a sua inclusão ou exclusão e gerando, portanto, diferentes isoformas da proteína.

Também se selecionou um SNP cuja variação é não sinônimo localizada no exon 2 (*rs34581041*, G = 100%). Este SNP causa a substituição do aminoácido arginina por triptofano na posição 108 do domínio IgV. da proteína CRiG (R108W) (KUMAR et al., 2009). Embora não haja estudos funcionais com a proteína alterada, até o momento, é possível que seja deletéria, (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?db=core;r=X:66033064-66034064;v=rs34581041;vdb=variation;vf=11065911). Acesso em 12/05/19), alterando a função da isoforma VSIG4 – 003. Os iniciadores direto e reverso (Tabela 1) foram desenhados de acordo com a sequência do gene *VSIG4* 66.021.738-66.040.125 no cromossomo X, e amplificam fragmentos de 792 pares de base (pb), com os iniciadores que acoplam na região promotora, 412 pb ao intron 1 e exon 2 e 768 pb ao intron 3 (Figura 8).

FIGURA 8 - SNPS DO GENE *VSIG4* E PROTEÍNA CRIG



FONTE: Adaptado de LANGNAESE et al., 2000.

LEGENDA: SP – peptídeo sinal; IgV – domínio extracelular de Ig tipo V; IgC2 – domínio extracelular de Ig tipo C2; TM – região transmembranar.

Para cada reação de PCR utilizou-se de 50 a 100 ng de DNA genômico. A solução de reação foi preparada com tampão coral (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), glicerol, MgCl₂, deoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), iniciadores

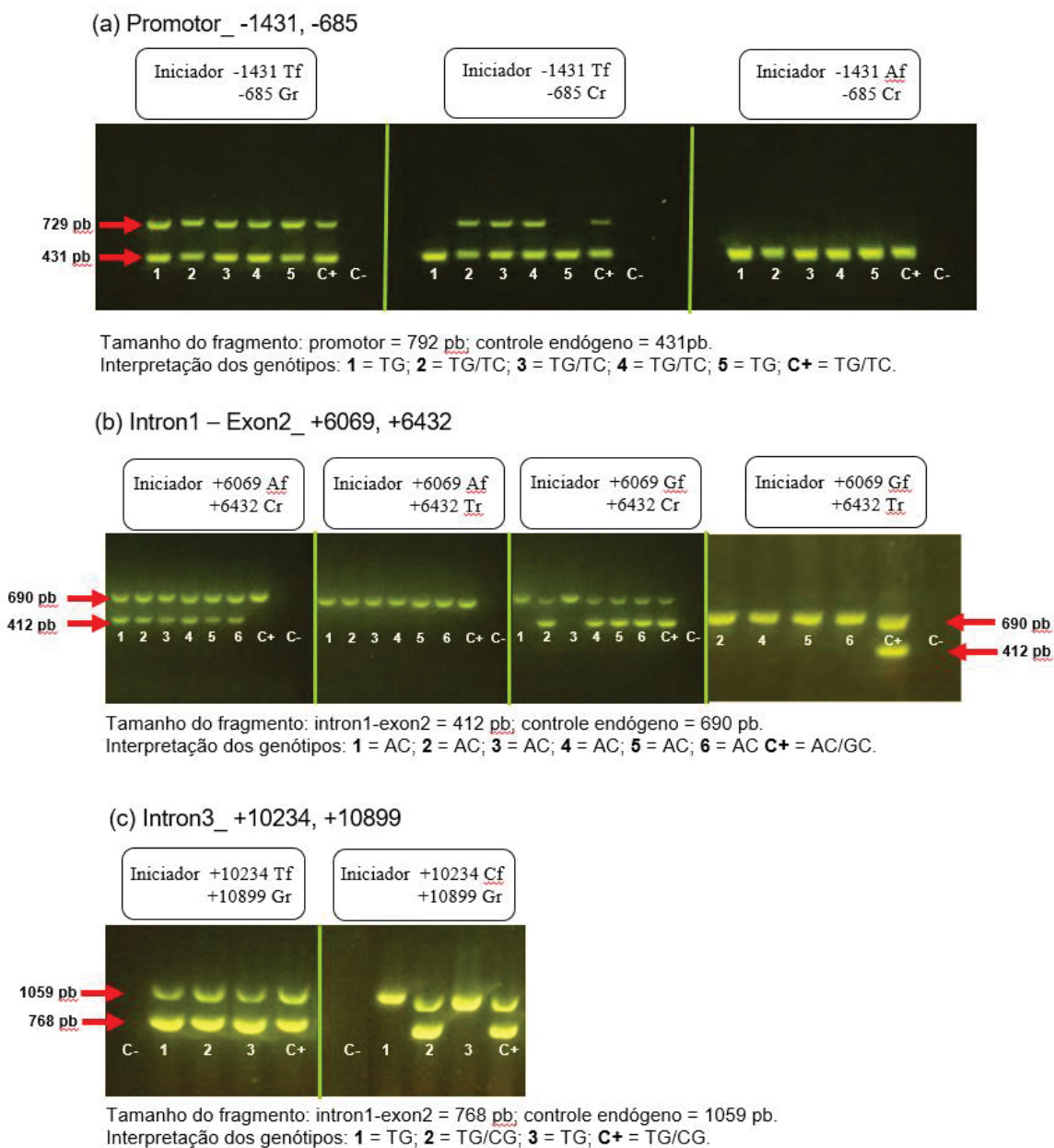
(Eurofins MWG Operon, CA, Estados Unidos), Taq DNA polimerase platinum (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Para amplificação do alelo G no intron 1_+6069, +6432 foi utilizada a solução Q (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos) para aumentar a especificidade da reação.

A PCR-SSP foi realizada em termociclador T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, CA, Estados Unidos) em 30-35 ciclos, temperatura de desnaturação de 94°C por 20 segundos, e temperatura de extensão de 72°C por 30 segundos. Em todas as reações de PCR, foram incluídos controles endógenos, controles positivos e controles negativos que são soluções de reação completas, sem o DNA. Para controle da reação de PCR, foi utilizado um controle endógeno específico, que consiste em um par de iniciadores genéricos, compatíveis com os iniciadores da PCR-SSP, que amplificam uma sequência específica não variável de um gene. O controle endógeno deve amplificar em todas as amostras testadas e nos controles positivos para validar uma reação de PCR. O controle positivo é constituído de uma amostra com genótipo conhecido, sendo utilizado para controle da genotipagem

As temperaturas de anelamento foram diferentes para cada reação, com diminuição da temperatura a cada 10-15 ciclos (PCR touchdown) para aumentar a especificidade e a sensibilidade, conforme descrito a seguir:

- Promotor_-1431,-685: 10 ciclos a 66°C, 10 ciclos a 64°C, 10 ciclos a 62°C;
- Intron1/Exon2_+6069, +6432: 10 ciclos a 70°C, 15 ciclos a 68°C, 10 ciclos 66°C;
- Intron3_+10234,+10899: 10 ciclos a 65°C, 10 ciclos a 63°C, 15 ciclos a 61°C.

A concentração e o volume dos reagentes utilizados para cada PCR estão listados nos apêndices 1, 2 e 3. A análise dos resultados da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A interpretação foi baseada no padrão de bandas coradas com corante Sybr®Safe (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA), as quais são fluorescentes sob luz azul. Os produtos amplificados foram comparados com marcador de peso molecular de 100 pb (KASVI, Curitiba, Paraná, Brasil). Os padrões eletroforéticos da PCR-SSP para o gene *VSIG4* estão demonstrados na figura 9.

FIGURA 9 - PADRÃO ELETROFORÉTICO DA PCR-SSP REALIZADA PARA O GENE *VSIG4*

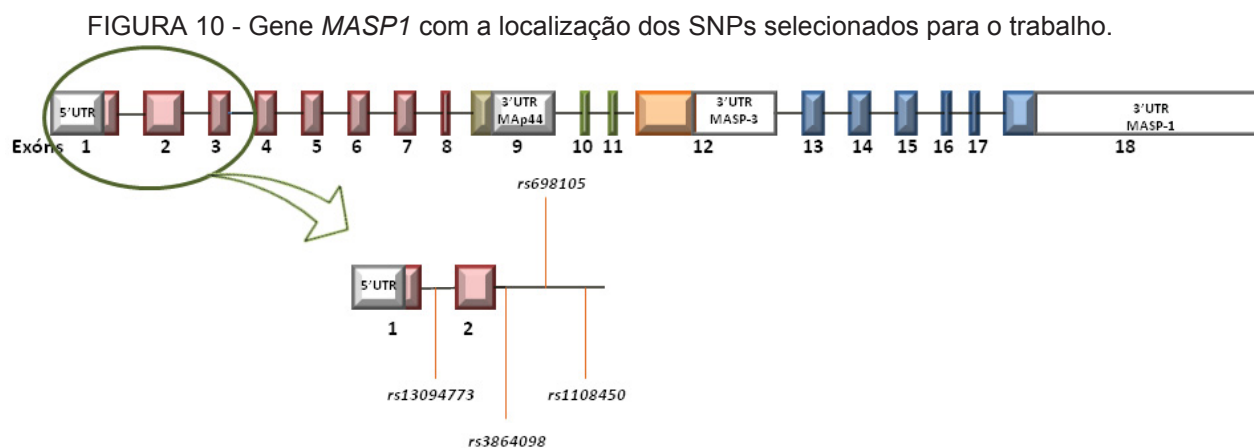
FONTE: O Autor (2018)

LEGENDA: C+, controle positivo; C-, controle negativo; f, iniciador direto; r, iniciador reverso.

4.4 PCR-SSP (MULTIPLEX) DO GENE *MASP1*

Quatro SNPs do gene *MASP1* (ENSG00000127241) (Figura 10) foram avaliados pelo método de reação em cadeia da polimerase sequencia especifica multiplex (PCR-SSP Multiplex): *rs13094773* (A> G) localizado no intron 1, e *rs698105* (T> C), *rs3864098* (T> C) e *rs1108450* (A> C) localizados no intron 2 (Tabela 2). Dois fragmentos específicos de

amplificação foram gerados, um com 731pb: para os *rs13094773* + *rs698105* e outro com 607pb: para os *rs3864098* + *rs1108450*. Um fragmento de controle de amplificação de 500 pb do gene FCN2 foi gerado simultaneamente.



FONTE: O Autor (2019).

TABELA 2 - Sequencias dos primers do gene *MASP1* utilizados na PCR-SSP multiplex.

dbSNP	5' – 3' forward primer	dbSNP	5' – 3' reverse primer	Amplicon
<i>rs13094773</i>	5'AAGAGAATCAAGAGTTAAATGAA3' 5'AAGAGAATCAAGAGTTAAATGAG3'	<i>rs698105</i>	5'CCTTGACCTGAATTCATACCA3' 5'CCTTGACCTGAATTCATACCG3'	731 pb
<i>rs3864098</i>	5'TTTAATGTCATATGTCCAACACAC3' 5'TTTAATGTCATATGTCCAACACAT3'	<i>rs1108450</i>	5'ATAGGGACCCTCAAGGACCT3' 5'ATAGGGACCCTCAAGGACCG3'	607 pb
<i>FCN2_Ex8</i>	5'AAAGGGTTGATTGCGGAAAC3'		5'AAAGGGTTGATTGCGGAAAC3'	500 pb

FONTE: O Autor (2019).

LEGENDA: pb:pares de base; dbSNP: database SNP.

A seguir, na Tabela 3, encontram-se os genótipos mais frequentes na população geral, europeia e africana, dos polimorfismos do gene *MASP1* selecionados para esse trabalho.

TABELA 3 - Frequência dos genótipos de *MASP1* encontrados na população geral, europeia e africana

ID rs ^a	Localização	Alelo ancestral	MAF ^b	Alelos possíveis	Frequência geral	Frequência pop EUR ^c	Frequência pop AFR ^d	Frequência Genótipo	Primer
rs3864 098	Intron 2	A	G = 0,20	G e A	A = 80% G = 20%	A = 84% G = 16%	A = 64% G = 36%	GG = 2% AA = 71% AG = 27%	Foward Cf e Tf
rs1108 450	Intron 2	T	G = 0,20	T e G	T = 80% G = 20%	T = 84% G = 16%	T = 64% G = 36%	TT = 65,4% GG = 4,9% TG = 29,8%	Reverse Tr e Gr
rs1309 4773	Intron 1	T	C = 0,29	T e C	T = 71% C = 29%	T = 66% C = 34%	T = 87% C = 13%	TT = 51,4% CC = 38,2% TC = 10,3%	Foward Gf e Af
rs6981 05	Intron 2	A	A = 0,25	A e G	A = 25% G = 75%	A = 14% G = 86%	A = 50% G = 50%	AA = 8,7% GG = 59,3% AG = 32%	Reverse Tr e Cr

FONTE: www.ensembl.org, acessado 1/07/2019

^aID rs: Identificação dos polimorfismos

^bMAF: Frequência do principal alelo

^cPop EUR: População europeia

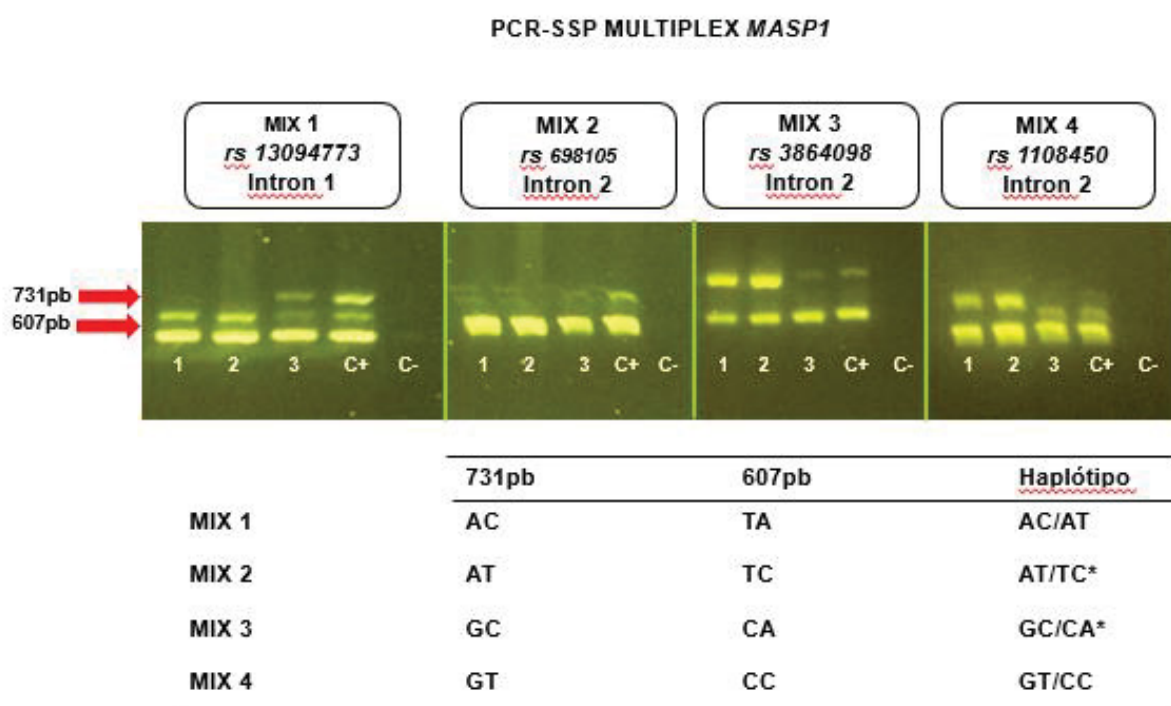
^dPop AFR: População africana

Alelos : A (adenina); T (timina); G (guanina); C (citosina)

A PCR foi realizada de acordo com o protocolo que utilizou 1 µL de DNA na concentração de 50 ng/µL, 25 mM de cada dNTP, 10 µM de cada primer, 50 mM de MgCl₂, 10µL tampão de PCR de 10x Coral Load com 2 corantes gel de rastreamento (Qiagen®) e 5U Polimerase Taq DNA (GoTaq® DNA Polymerase, Promega, EUA), num volume final de 15 µl. O protocolo de amplificação inicia-se com a desnaturação por 5 minutos a 95 ° C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94 ° C, 30 segundos à temperatura de anelamento específico e 30 segundos a 72 ° C, finalizando com a etapa de extensão do DNA de duração de 5 minutos a 72 ° C.

A análise dos resultados da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. A interpretação foi baseada no padrão de bandas coradas com corante Sybr®Safe (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, EUA), as quais são fluorescentes sob luz azul. Os produtos amplificados foram comparados com marcador de peso molecular de 100 pb (KASVI, Curitiba, Paraná, Brasil). Os padrões eletroforéticos da PCR-SSP Multiplex para o gene *MASP1* estão demonstrados na figura 11.

FIGURA 11 - PADRÃO ELETROFORÉTICO DA PCR-SSP MULTIPLEX REALIZADA PARA O GENE *MASP1*



FONTE: O autor (2019).

LEGENDA: C+, controle positivo; C-, controle negativo; controle endógeno; * falso+, haplótipo que não ocorrem; FCN2ex: 500pb. Interpretação dos hapótipos: **1** = GC/GT (731pb) / TA/TA (607pb); **2** = GC/GT (731pb) / TA/TA (607pb); **3** = AC/AC (731pb) / TA/CC (607pb); **C+** = AC/AT (731pb) / TA/CC (607pb).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

4.5.1 Caracterização da população de pacientes em estudo – VSIG4

Foram analisadas amostras de DNA de 179 pacientes com LES, dos quais 94% (168/179) eram do sexo feminino e 6% (11/179) do sexo masculino (Figura 12), caracterizando uma população entre mulheres e homens de 15:1. A idade dos pacientes variou de 18 a 72 anos (média de 40,0 anos) no momento da coleta de sangue. Destes, 28,5% (51/179) apresentavam-se na faixa etária entre 18-30 anos, 67% (120/179) entre 31-60 anos e 4,5% (8/179) acima de 60 anos (Figura 13).

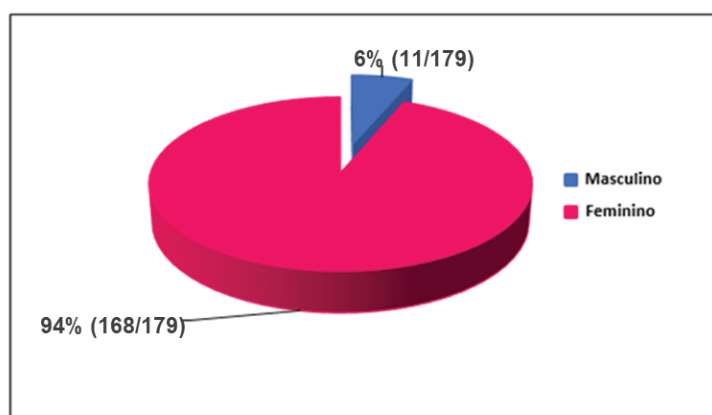
Os dados demográficos dos pacientes foram coletados através do questionário aplicado no momento da coleta de sangue e/ou da análise de prontuários e podem ser observados na TABELA 4.

TABELA 4 - Características dos pacientes e comparação com controles (VSIG4)

Parâmetros VSIG4	Controles	Pacientes	Valor de p
N	156	179	
Média de idade [Min-Max]	37 [18-69]	40 [18-72]	0,056
Sexo (%)			
Masculino	9 (6 %)	11 (6 %)	1,000
Feminino	147 (94 %)	168 (94 %)	
Etnia (%)*			
Euro-brasileiro	129 (83 %)	132 (76 %)	0,137
Afrodescendente	27 (17 %)	42 (24%)	

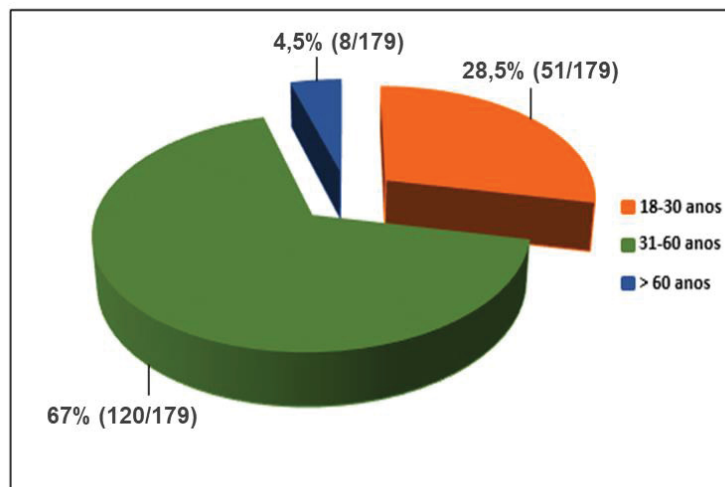
*5 pacientes não possuem informação sobre etnia

FIGURA 12 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM LES EM FUNÇÃO DO SEXO



FONTE: O Autor (2019).

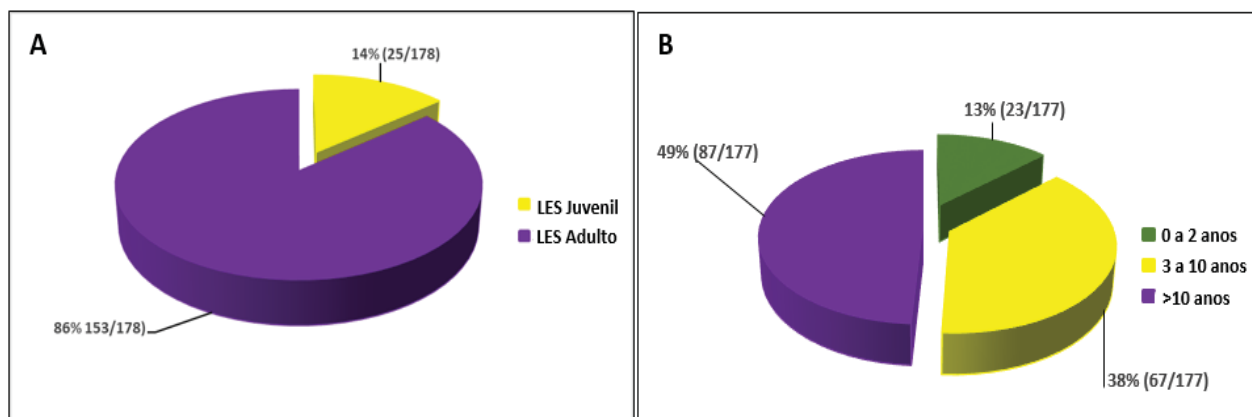
FIGURA 13 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM LES EM FUNÇÃO DA FAIXA ETÁRIA



FONTE: O Autor (2019).

Visando análise e associações clínicas posteriores foram levantados dados referentes à idade de início da doença (LES Juvenil < 16 anos e LES Adulto > 16 anos; FIGURA 14-A) e duração da doença (0 a 2 anos, >2 a 10 anos e > 10 anos; FIGURA 14-B). Os dados mostraram que 14% (25/178) dos pacientes tiveram LES juvenil e 86% (153/178) iniciaram a doença já adultos. Em relação a duração da mesma, predominam pacientes com mais de 10 anos com a doença (49%; 87/177) comparados com aqueles com a doença mais recente (0 a 2 anos; 13%; 23/177) ou de duração intermediária (3 a 10 anos; 38%; 67/177) (FIGURA 13-B).

FIGURA 14 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM LES EM FUNÇÃO DA IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA (A) E DURAÇÃO DA DOENÇA (B)



FONTE: O Autor (2019).

Encontra-se na Tabela 5 a caracterização do perfil de atividade da doença (SLEDAI) no momento da coleta de material e na Tabela 6 o perfil de dano permanente (SLICC/ACR-DI) da população de estudo.

TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA ESTUDADA DE ACORDO COM PONTUAÇÃO DO SLEDAI

PONTUAÇÃO SLEDAI	Nº PACIENTES	PONTUAÇÃO SLEDAI	Nº PACIENTES
0	50 (28,0%)	10	1 (0,6%)
1	5 (2,8%)	12	6 (3,3%)
2	27 (15,0%)	14	4 (2,2%)
3	1 (0,6%)	16	4 (2,2%)
4	33 (18,4%)	17	1 (0,6%)
5	1 (0,6%)	19	2 (1,1%)
6	20 (11,1%)	22	2 (1,1%)
7	1 (0,6%)	26	1 (0,6%)
8	16 (9,0%)	38	1 (0,6%)
9	3 (1,6%)		

FONTE: O autor (2019).

SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index.

TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA ESTUDADA QUANTO AO GRAU DE DANO CUMULATIVO MEDIDO PELO SLICC/ACR-DI

PONTUAÇÃO SLICC/ACR-DI	Nº DE PACIENTES
0	73 (40,8%)
1	49 (27,4%)
2	28 (15,6%)
3	19 (10,6%)
4	7 (3,9%)
5	2 (1,1%)
6	1 (0,6%)

SLICC/ACR-DI: Systemic Lupus International Colaborating Clinics/ American College of Rheumatology – Damage Index

4.5.2 Caracterização da população de pacientes em estudo – MASP1

Foram analisadas amostras de DNA de 128 pacientes com LES, dos quais 94,5% (121/128) são do sexo feminino e 5,5% (7/128) do sexo masculino (Figura 15), caracterizando uma população entre mulheres e homens de 17,3:1. A idade dos pacientes variou de 18 a 72 anos (média de 39,3 anos) no momento da coleta de sangue. Destes,

32% (41/127) apresentavam-se na faixa etária entre 18-30 anos, 64% (83/127) entre 31-60 anos e 4% (5/127) acima de 60 anos (Figura 16)

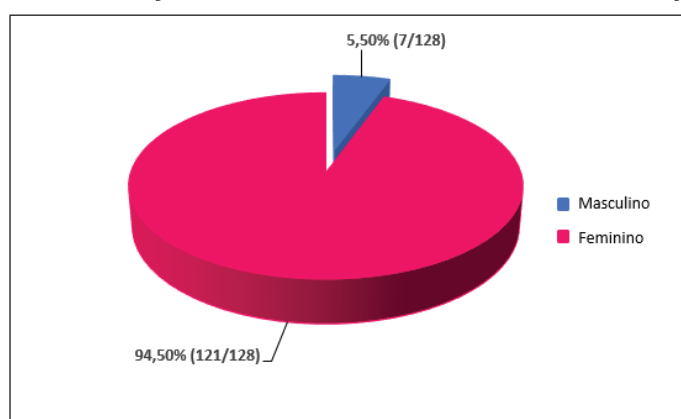
Os dados demográficos dos pacientes foram coletados através do questionário aplicado no momento da coleta de sangue e/ou da análise de prontuários e podem ser observados na TABELA 7.

TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS DOS CONTROLES E COMPARAÇÃO COM PACIENTES (MASP1)

Parâmetros MASP1	Controles	Pacientes	p
N	128	128	
Média de idade ± Desvio Padrão [Mín-Máx]	38,02 ±10.2 [18-72]	39,39 ±12.5 [18-72]	0,42
Sexo (%)			
Masculino	7 (5,5 %)	7 (5,5 %)	1,00
Feminino	121 (94,5 %)	121 (94,5 %)	
Etnia (%)			0,18
Euro-brasileiro	110 (86 %)	96 (79%)	
Afrodescendente	18 (14 %)	25 (21%)	

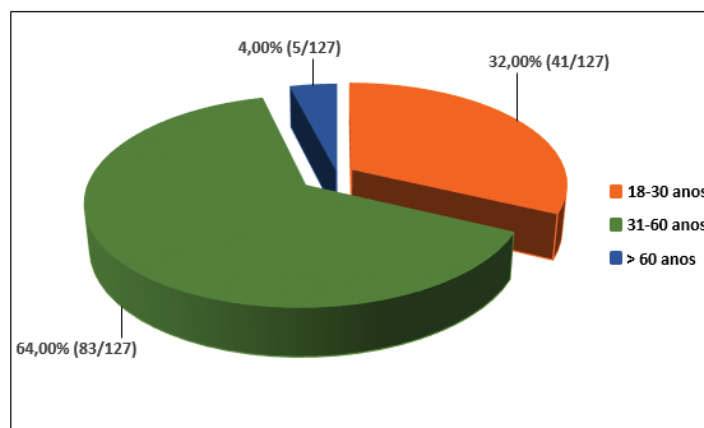
FONTE: O Autor (2019).

FIGURA 15 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM LES EM FUNÇÃO DO SEXO



FONTE: O autor (2019).

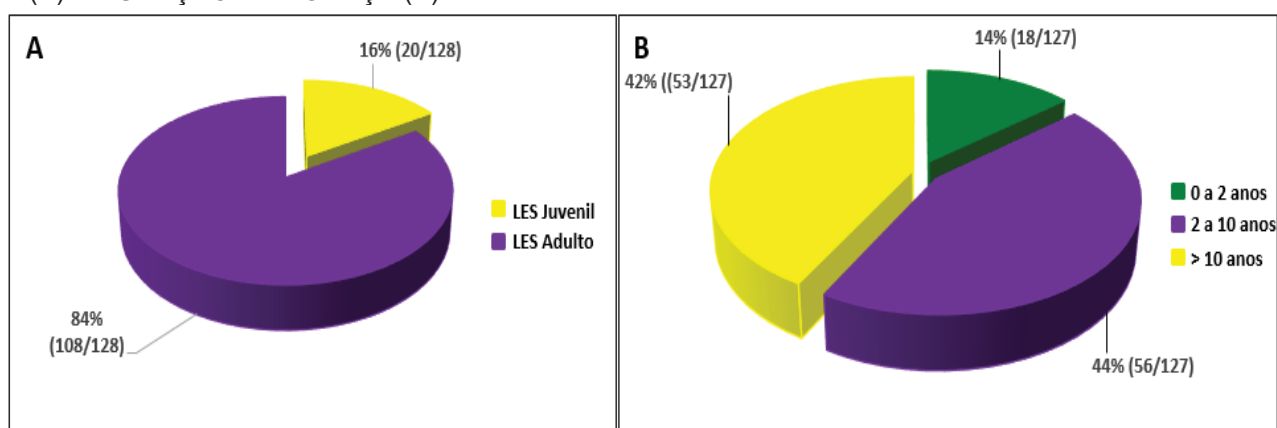
FIGURA 16 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM LES EM FUNÇÃO DA FAIXA ETÁRIA



FONTE: O Autor (2019).

Visando análise e associações clínicas posteriores foram levantados dados referentes à idade de início da doença (LES Juvenil < 16 anos e LES Adulto > 16 anos; FIGURA 17-A) e duração da doença (0 a 2 anos, >2 a 10 anos e > 10 anos; FIGURA 17-B). Os dados mostraram que 16% (20/128) dos pacientes tiveram LES juvenil e 84% (108/128) iniciaram a doença já adultos. Em relação a duração da mesma, predominam pacientes entre 2 a 10 anos (44%; 56/127) comparados aos pacientes com doença mais recente (0 a 2 anos; 14%; 18/127) ou mais antiga (>10 anos; 42%; 53/127) (FIGURA 17-B).

FIGURA 17 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM LES EM FUNÇÃO DA IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA (A) E DURAÇÃO DA DOENÇA (B)



FONTE: O Autor (2019).

Encontra-se na Tabela 8 a caracterização do perfil de atividade da doença (SLEDAI) no momento da coleta de material e na tabela 9 o perfil de dano permanente (SLICC/ACR-DI) da população de estudo.

TABELA 8 - DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA ESTUDADA DE ACORDO COM PONTUAÇÃO DO SLEDAI

PONTUAÇÃO SLEDAI	Nº PACIENTES	PONTUAÇÃO SLEDAI	Nº PACIENTES
0	37 (29,0%)	9	2 (1,5%)
1	3 (2,3%)	10	1 (0,8%)
2	18 (14,0%)	12	6 (4,7%)
3	1 (0,8%)	14	4 (3,1%)
4	22 (17,2%)	16	3 (2,3%)
6	15 (11,7%)	17	1 (0,8%)
7	1 (0,8%)	22	1 (0,8%)
8	12 (9,4%)	38	1 (0,8%)

FONTE: O Autor (2019).

SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease activity index.

TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO DA AMOSTRA ESTUDADA QUANTO AO GRAU DE DANO CUMULATIVO MEDIDO PELO SLICC/ACR-DI

PONTUAÇÃO SLICC/ACR-DI	Nº PACIENTES
0	55 (43,0%)
1	30 (23,4%)
2	21 (16,4%)
3	16 (12,5%)
4	4 (3,1%)
5	1 (0,8%)
6	1 (0,8%)

FONTE: O Autor (2019).

SLICC/ACR-DI: Systemic Lupus International Colaborating Clinics/ American College of Rheumatology – Damage Index.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A estatística descritiva dos dados demográficos foi realizada através do programa Graphpad Prism 6 (Graphpad software, Prism 6 for MAC OS X). As frequências alélicas, haplotípicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta. A estimativa de fase gamética e haplotípica, foi feita por reconstrução baseada em algoritmo pseudo Baesyano com o pacote de programas ARLEQUIN v.3.5 (Excoffier and Lischer 2010). As hipóteses de

equilíbrio de Hardy-Weinberg foram avaliadas utilizando o teste de Guo e Thompson (2010) no pacote de programas ARLEQUIN v.3.5. Para as análises de associação foram realizados os testes de independência entre as variáveis utilizando-se teste de Fisher bicaudal e regressão logística binária no programa STATA 9.0. As covariáveis idade, etnia, sexo, duração da doença, idade de início da doença, manifestações clínicas, escore de SLICC/ACR-DI e SLEDAI foram incluídas no modelo de regressão logística quando a análise univariada mostrou $p \leq 0,2$. A escolha do melhor modelo de herança foi realizada utilizando-se as informações de Akaike (AIC) para minimizar a entropia esperada. O desequilíbrio de ligação (DL) entre polimorfismos foi obtido através do programa Haploview 4.2 (<http://broadinstitute.org/haploview/haploview>). Quando apropriado, foi calculado o *odds ratio*, com intervalo de confiança de 95%. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisados SNPs de dois genes distintos, *VSIG4* e *MASP1*, e para facilitar a compreensão, os resultados e discussão foram divididos em dois artigos, referentes a cada gene respectivamente. Em alguns pacientes não foi possível obter todos os dados do questionário e em algumas amostras não houve amplificação pela técnica de PCR-SSP, justificando a diferença da quantidade de pacientes nos dois artigos.

5.1 ARTIGO *VSIG4*

IMPACT OF *VSIG4* GENE POLYMORPHISMS IN THE CUMULATIVE ORGAN DAMAGE IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Abstract

Complement activation is associated with development and clinical presentation of Systemic lupus erythematosus (SLE). The Complement Receptor of the Immunoglobulin superfamily (CRIg; *VSIG4* gene, Xp12) is a macrophage receptor that presents a key role in the clearance of complement-opsonized immune complexes and inhibition of the alternative pathway of complement. Although a role for CRIg in inflammatory diseases, including SLE, has been proposed, the impact of *VSIG4* polymorphisms in SLE has not yet been explored. We aimed to evaluate possible influence of *VSIG4* polymorphisms in the susceptibility, clinical and serological profile and cumulative damage measured by SLICC/ACR-DI score in SLE patients. Six *VSIG4* polymorphisms were assessed by sequence-specific PCR in a Brazilian cohort of 179 patients with SLE and 156 healthy controls matched for age, gender and ethnicity. We found two *VSIG4* haplotypes (*TGGCCG* and *TGACCG*) associated with higher median of SLICC/ACR-DI score ($p_{\text{adj}}=0.017$), deforming arthritis ($p_{\text{adj}}=0.041$), diabetes ($p_{\text{adj}}=0.008$) and positivity of Coombs test ($p_{\text{adj}}=0.015$) in women with SLE. Our findings suggest a role for *VSIG4* polymorphisms in the pathophysiology of SLE in women, possibly by impairing CRIg function in the clearance of immune complexes and inhibition of complement activation.

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by loss of immune tolerance to autoantigens and production of autoantibodies and immune complexes, leading to inflammatory response and tissue destruction [1, 2, 3]. Deficiencies in components of the complement pathway (including C1q, C4, CR1) are associated with an increased risk for the development of SLE, while the excessive activation of the complement leads to tissue inflammation and damage [4,5].

The Complement Receptor of the Immunoglobulin superfamily (CR1g; *VSIG4* gene; Xp12) is a macrophage receptor [6] that presents a key role in the clearance of C3-opsonized pathogens, immune complexes and autologous cells [6,7]. CR1g is also a potent inhibitor of the alternative pathway (AP) of complement through blockade of the C3 and C5 convertases [8]. In addition to its activity as a complement receptor, CR1g has been reported to be a strong inhibitor of murine and human T-cell proliferation and IL-2 production [9]. CR1g is mainly expressed on tissue resident and sinusoidal macrophages and highly detected in lung, placenta and liver [10,11]

CR1g was able to reduce lupus nephritis and cutaneous disease in a murine model of SLE, possible by inhibitory the AP activation [10]. Moreover, the involvement of CR1g in the pathogenesis of other inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis, atherosclerosis and type 1 diabetes has been reported [10,12–14]. Although a role for CR1g in inflammatory diseases, including SLE, has been proposed, the impact of *VSIG4* polymorphisms in SLE has not yet been explored. In this study we investigated the influence of six *VSIG4* gene polymorphisms in the susceptibility and clinical manifestation of SLE.

Methods

Subjects and samples. A total of 179 patients with SLE (94% female, mean age 40 years age, ranging from 18 to 72 years, 76% were Euro-Brazilian and 24% were Afro-Brazilian) from Curitiba, southern Brazil, were enrolled in this study. All patients were diagnosed with SLE according to the American College of Rheumatology criteria [15] in the Rheumatologic Unit of the Evangelic Hospital of Curitiba (Brazil) and consecutively included in the study. The cumulative damage profile was evaluated by SLICC/ACR-DI (Systemic Lupus Erythematosus International Collaborating Clinics damage index score). Moreover, the SLEDAI score (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) were also measured to access the disease activity [16]. In addition, clinical and autoantibody profile

(anti- dsDNA, anti Ro/SS-A, anti La/SS-B, anti-RNP, anti-Sm, aCI IgG, aCI IgM, LA) and direct Coombs testes were also obtained. Clinical profile and demographic data were summarized in table 1 and were obtained from medical records and by interviews using a standard questionnaire. As control subjects, 156 healthy unrelated blood donors, matched for age, gender and ethnicity with 179 patients, were recruited. All patients and control subjects provided written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was approved by the Ethics Research Committee of the Sociedade Evangélica Beneficente, Curitiba, Brazil.

DNA Extraction, polymorphisms selection and genotyping. DNA extraction was performed using QIAamp DNA extraction kits (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. A total of six *VSIG4* SNPs (single nucleotide polymorphisms) were assessed by sequence-specific amplification method (PCR-SSP): *rs2284705:T>A* (g.66041429) and *rs5964489:G>C* (g.66040683) in the promoter region, *rs5964488:A>G* (g.66033927) in intron 1, *rs34581041:C>T* (g.66033564; p.Arg108Trp) in exon 2 and *rs5964487:T>C* (g.66029762) and *rs9887348:A>G* (g.66029097) in intron 3 (reference sequence: ENST00000374737.9). *VSIG4* polymorphisms were selected based on allelic frequency (MAF-minor allele frequency) of European and African population of the Ensembl database [17]. A 798bp fragment was amplified using the primer pairs that binding to promoter region, 412bp to intron 1 and 768 to intron 3. A control fragment of 431 bp and 690bp of HGH gene, and 1059 bp of MBL gene was simultaneously generated (supplementary table 1). PCR was carried out in a final volume of 15 µl in a T100TM thermocycler (BioRad). PCR conditions were as follows: 0.2 µM for promoter primers, 0.7 µM for intron 1 and exon 2 and 0.5 µM for intron 3 SSP primers, 0.04-0.15 µM control primers, 1 × Coral Load PCR buffer (Qiagen, Hilden, Germany), 0.4 mM MgCl₂ (only for intron 3 primers reaction, Qiagen, Hilden, Germany), 0-2.35% glycerol, 0.2 mM deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 0.25% Q Solution (only for intron 1 and exon 2 primers reaction, Qiagen, Hilden, Germany), 0.03-0.05 U/µl of Taq polymerase Platinum (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 20 ng/µl DNA and water to complete the final volume. The amplification protocol starts with a 3 min denaturation step at 96°C, followed by 35 cycles of 15 sec at 94°C, 30 sec at the specific annealing temperature and 30 sec at 72°C, concluding with 5 min at 72°C in the final DNA extension step. Annealing temperature decreased every 10 cycles (66°C, 64°C and 62°C for promoter primers; 70°C, 68°C and 66°C for intron 1 exon 2 primers and

65°C, 63°C and 61°C for intron 3 primers) according to a previously published “touch-down” strategy which assures higher specificity to the amplification, while providing a larger amount of the desired PCR product [18]. Interpretation was based on the electrophoretic pattern of the amplified fragments, on agarose gels 1.5% stained with SYBRsafe (Invitrogen, São Paulo, Brazil).

In Silico Analysis. *VSIG4* polymorphisms were analysed by Human Splicing Finder version 3, HSF3 [16] to predict its possible effects on *VSIG4* mRNA splicing. The investigated polymorphisms were also evaluated for regulatory effects on *VSIG4* gene expression using The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project [19], Bood eQTL browsers (<https://genenetwork.nl/boodeqtlbrowser/>). The UCSC Genome Browser was used to evaluate possible transcription factor binding specifically to the *VSIG4* SNPs regions as well as DNA methylation and histone modifications (<https://genome.ucsc.edu/>). EpiGenome Browser was used to evaluate histone modifications in the *VSIG4* SNPs regions <https://epigenomegateway.wustl.edu/browser/>.

Statistical analysis. Genotype and allele frequencies were obtained by direct counting. The hypothesis of Hardy-Weinberg equilibrium was tested for genes on the X chromosome according to Beiguelman 2008 [20] and in women by expectation-maximum algorithms using the Arlequin v.3.5.2.2 software (<http://lgb.unige.ch/arlequin>). Since *VSIG4* gene is located in the X chromosome, classic biallelic genotypes of SNPs are observed only in women. Stratify by sex seems to be the most appropriate strategy to compare genotypic distribution in mixed sex studies, though it leads to loss of statistical power, avoid apparent associations raised due different sex ratio between cases and controls [21, 22]. *VSIG4* haplotypes were estimated using ARLEQUIN software package version 3.1. Tests of independence between patients and controls, as well as between clinical variables were performed through Chi-square and Fisher exact test using GraphPad Prism 3.0 software package. Logistic regression was performed using STATA v.9.2 (Statacorp, USA). The covariables age, ethnic, sex, disease duration, age of disease onset, clinical manifestations, serological profile, SLICC/ACR-DI and SLEDAI scores were included in the logistic regression model when univariate analysis showed $p \leq 0.2$. Adjusted odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI) were calculated. Linkage disequilibrium (LD) between studied polymorphisms in female patients and controls were obtained with the Haploview 4.2

program (<http://broadinstitute.org/haploview/haploview>). LD was measured by the coefficient of linkage disequilibrium (D') between sites. Two-tailed P values less than 5% were considered significant.

Results

VSIG4 polymorphisms and haplotypes. The genotype frequencies for the six *VSIG4* SNPs were in Hardy–Weinberg equilibrium in healthy controls and patients. No significant association were observed comparing *VSIG4* allele and genotype frequencies between patients with LES and controls neither between presence/ absence of organ/system damage such as cardiovascular, musculoskeletal, pulmonary, kidney, eye, endocrinological, neoplastic and neuropsychiatric alterations. Moreover, the SLICC/ACR-DI score, autoantibody profile and age of disease onset were also no associated with *VSIG4* SNPs. The distribution of allele and genotype frequencies of the six studied polymorphisms is described in the supplementary table 2.

High linkage disequilibrium (LD) was observed between *VSIG4* polymorphisms in controls ($D' > 0.8$) and SLE ($D' > 0.8$) in women. LD could not be measured with *rs2284705* and *rs34581041* since these SNPs were monomorphic. Different combinations of investigated polymorphisms resulted in seven haplotypes which were all present in women and three found in men (supplementary table 2). We found two *VSIG4* haplotypes (*TGGCCG* and *TGACCG*) associated with cumulative organ damages, positivity of Coombs test and higher median of SLICC/ACR-DI score in women. The *VSIG4 TGGCCG* haplotype was more frequent in women with SLE and diabetes ($p_{adj} = 0.008$; OR 8.7; 95%IC [1.77-42]) and direct Coombs' test-positive ($p_{adj} = 0.015$; OR 5.4; 95%IC [1.38-21]), while the *VSIG4 TGACCG* was more prevalent in those with deforming arthritis ($p_{adj} = 0.041$; OR 3.4, 95%IC [1.11-87], Table 2). Moreover, we observed an association between the *VSIG4 TGGCCG+TGACCG* haplotypes and higher median of SLICC/ACR-DI score in women (carriers = 1.7 ± 1.3 vs. non carriers median = 1.0 ± 1.2 ; $p_{adj} = 0.017$, Figure 1). Women carries of *VSIG4 TGGCCG+TGACCG* (80%, 12/15) had at least one cumulative damage ($p_{adj} = 0.038$; OR 4.6, 95%IC [1.08-14], Figure 1). These associations were not observed in men after gender stratification. The other haplotypes (*TGACTA*, *TCGCCG*, *TCACTA*, *TCACCG*, *TGGCTA*) were not associated with LES neither with other clinical characteristics evaluated here.

In Silico predictions of *VSIG4* SNPs. Since the *rs5964489G* (promoter region), *rs5964487C* and *rs9887348G* (intron 3) alleles, were observed in cis conformation exclusively in the risk haplotypes (*TGGCCG* and *TGACCG*), we performed *in silico* analysis to predict possible influences of these SNPs. According to the UCSC and EpiGenome Browsers, the *rs5964489* (promoter region) is in a position enriched for typical histone modifications known to be associated to active regulatory elements (H3K27ac—H3 acetylated at lysine 27 and H3K4me1- H3 monomethylated at lysine 4) in hematopoietic, monocytes and lymphoblastoid cell lines. In addition, the *rs5964489* is in a binding site to transcription factors such as Pol II (RNA polymerase II) and CTCF (CCCTC-binding factor), the most evident regulatory proteins that may bind to this region, as seen by chromatin immunoprecipitation assay (<https://genome.ucsc.edu/>). Since *rs5964487* and *rs9887348* (intron 3) are surrounding the alternative exon 3, we used *in silico* analyses to evaluate possible influence on alternative splicing of *VSIG4* precursor mRNA. The Human Splicing Finder results showed that *rs5964487C* (intron 3) and the *rs9887348G* (intron 3) alleles might disrupt potential intronic ESSs (Exonic Splicing Silencers) sites, but with a probably no impact on splicing. In addition, both SNPs are not in a region enriched by DNA methylation and histone modifications, known to impact on splicing process (UCSC genome browser). The *rs5964489* (promoter), *rs5964487* and *rs9887348* (intron 3) seems not to influence the *VSIG4* gene expression in the cell lines evaluated in the GTEx and Bood eQTL browsers.

Discussion

This is the first study addressing the association of *VSIG4* gene polymorphisms and SLE. Although the studied *VSIG4* SNPs were not associated with susceptibility to the disease, we observed two *VSIG4* haplotypes (*TGGCCG* and *TGACCG*) related with higher cumulative damage score, positivity of Coombs test, deforming arthritis and diabetes in women with SLE. Our results suggest a role for the *VSIG4* gene in the pathophysiology of SLE in women, possibly by impairing CR1g function in the clearance of immune complexes and inhibition of complement activation.

According to the *in silico* analysis the *rs5964487C* and *rs9887348G* alleles (intron 3) probably have no impact in the alternative splicing of *VSIG4* pre-mRNAs or in the gene expression. Thus, we suggest that the described associations are possibly due to a functional polymorphism not studied here. More than 100 variants are in high LD with *rs5964487C* and *rs9887348G* alleles (intron 3) (<https://ldlink.nci.nih.gov>), most of them are

rare and in intron/intragenic region. However, the SNP *rs41306131:C>A* (p.Val92Phe; MAF=2%; D'=1) is in the exon 2 of the *VSIG4* gene with the *rs41306131A* allele predicted to have a functional impact with a likely deleterious effect on protein function (<https://cadd.gs.washington.edu/snv>). Importantly, the exon 2 of the *VSIG4* gene encodes the IgV domain, which binds to C3b to mediate phagocytosis of immune complexes and autologous cells [6, 7]. In addition, the CR1g inhibitory role on AP activation depends on its ability to bind C3b and mutations in the interaction region can abrogate CR1g-C3b binding and inhibit AP about 50-fold [8]. Thus, we hypothesized that the associations observed here are in part due to a strong LD with the functional *VSIG4 rs41306131A* allele, which might contribute to impairment of CR1g function in the clearance of complement-opsonized immune complexes [6,13] and in the inhibition of complement activation in SLE patients [8].

In addition, risk haplotypes also present the *rs5964489G* allele (promoter region), which, according to the in silico analysis, probably participate in the control of *VSIG4* gene expression. Indeed, regulatory proteins were observed to bind to the SNP region by chromatin immunoprecipitation assay (USCS genome Browser). Thus, we suggest that the *rs5964489G* allele may facilitate the binding of transcription factors, leading to amplified *VSIG4* gene expression in SLE patients. High *VSIG4* gene expression was observed as a risk factor for high-grade glioma [23], development of lung cancer [24], breast tumorigenesis [25] and severe preeclampsia [26].

It is interesting to note that the associations observed here occurred with *VSIG4* haplotypes rather than genotypes/alleles, indicating an additive effect of the polymorphisms. Therefore, high expression of CR1g with impaired functions on phagocytosis and complement inhibition due to *VSIG4* polymorphisms might contribute to the observed higher cumulative damage score, deforming arthritis, diabetes and positivity of Coombs test in women with SLE.

The involvement of CR1g in the SLE pathophysiology as well as in the arthritis and diabetes development has already been proposed [12,13, 14]. CR1g was able to reduce murine lupus nephritis and cutaneous disease in lupus-prone mice [12] and reverse established inflammation and bone destruction in experimental autoimmune arthritis by inhibiting the AP of complement [13]. In addition, CR1g was related to lower diabetes incidence in type-1 diabetes murine model possibly by CR1g's activity as a negative regulator of T cell activation and in the phagocytosis of apoptotic beta cells [14]. Thus, we suggest that *VSIG4* polymorphisms might impair CR1g anti-inflammatory function leading to

excessive AP activation which in turn may promote inflammation and tissue damage related to deforming arthritis [27], as well as decrease in the immune tolerance observed in type-1 diabetes due reduced phagocytosis of apoptotic cell [14].

We also observed an association between *VSIG4* TGGCCG haplotype and positivity of direct Coombs test. The direct Coombs test detects both anti-erythrocyte antibody binding to the surface of red blood cells and immune complex binding to complement binding receptor type 1 (CR1) [28]. A positive Coombs test is a hallmark of autoimmune hemolytic anemia, however, immune complex binding to CR1 is not associated with hemolysis [29]. In this context, we hypothesized that the erythrophagocytosis mediated by CR1g on splenic and liver macrophages might be reduced, leading the erythrocyte complexed with immunoglobulins and/or immune complex return to circulation. Although the clinical significance of this find requires further studies, it is interesting to note that a positive direct Coombs' test was associated with hemolytic anemia in SLE patients and other lupus manifestations such as antiphospholipid antibody syndrome, anti-RNP and anti-La antibodies in a study that used the same cohort studied here [30].

This study has some limitations. The predicted in silico role for *rs5964489G* and *rs41306131A* alleles in *VSIG4* gene needs to be confirmed by functional assays in order to assess the accuracy of these predictions and to verify the hypothesis raised here. Despite the relative low number of patients, especially males, we tried to ensure more confidence in the results by performing robust statistical analyses, such as regression analysis considering clinical and demographic variables.

In summary, our findings suggest a role for *VSIG4* polymorphisms in the pathophysiology of SLE in women possibly by impairing CR1g function in the clearance of immune complexes and inhibition of complement activation. Although the present study contributes to a better understanding of the genetic factors related to SLE, further clinical and molecular studies with larger sample size are required in order to elucidate the role of *VSIG4*/CR1g in the pathophysiology of SLE.

References

1. Zhu, Z., et al., *Discovery of a novel genetic susceptibility locus on X chromosome for systemic lupus erythematosus*. Arthritis research & therapy, 2015. **17**(1): p. 349.
2. Kuo, C.-F., et al., *Familial aggregation of systemic lupus erythematosus and coaggregation of autoimmune diseases in affected families*. JAMA internal medicine, 2015. **175**(9): p. 1518-1526.
3. Sawada, T., D. Fujimori, and Y. Yamamoto, *Systemic lupus erythematosus and immunodeficiency*. Immunological medicine, 2019. **42**(1): p. 1-9.
4. Ballanti, E., et al., *Complement and autoimmunity*. Immunologic research, 2013. **56**(2-3): p. 477-491.
5. Lintner, K.E., et al., *Early components of the complement classical activation pathway in human systemic autoimmune diseases*. Frontiers in immunology, 2016. **7**: p. 36.
6. Helmy, K.Y., et al., *CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens*. Cell, 2006. **124**(5): p. 915-927.
7. Small, A.G., et al., *Complement receptor immunoglobulin: a control point in infection and immunity, inflammation and cancer*. Swiss medical weekly, 2016. **146**(1314).
8. Wiesmann, C., et al., *Structure of C3b in complex with CR1g gives insights into regulation of complement activation*. Nature, 2006. **444**(7116): p. 217.
9. Vogt, L., et al., *VSIG4, a B7 family-related protein, is a negative regulator of T cell activation*. The Journal of clinical investigation, 2006. **116**(10): p. 2817-2826.
10. Lee, M.Y., et al., *Z39Ig is expressed on macrophages and may mediate inflammatory reactions in arthritis and atherosclerosis*. Journal of leukocyte biology, 2006. **80**(4): p. 922-928.
11. Walker, M.G., *Z39Ig is co-expressed with activated macrophage genes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 2002. **1574**(3): p. 387-390.
12. Lieberman, L.A., et al., *Complement receptor of the immunoglobulin superfamily reduces murine lupus nephritis and cutaneous disease*. Clinical Immunology, 2015. **160**(2): p. 286-291.
13. Katschke, K.J., et al., *A novel inhibitor of the alternative pathway of complement reverses inflammation and bone destruction in experimental arthritis*. Journal of Experimental Medicine, 2007. **204**(6): p. 1319-1325.

14. Fu, W., et al., *Early window of diabetes determinism in NOD mice, dependent on the complement receptor CR1g, identified by noninvasive imaging*. Nature immunology, 2012. **13**(4): p. 361.
15. Hochberg, M.C., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 1997. **40**(9): p. 1725-1725.
16. Gladman, D.D., D. Ibanez, and M.B. Urowitz, *Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000*. The Journal of rheumatology, 2002. **29**(2): p. 288-291.
17. Cunningham, F., A. MR, and D. Beal, *Nucleic Acids Research*. Database issue. Available from :D662-D669.: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=X:66033064-2015. **43**.
18. Boldt, A.B.W. and M.L. Petzl-Erler, *A new strategy for mannose-binding lectin gene haplotyping*. Human mutation, 2002. **19**(3): p. 296-306.
19. GTEx, *Genotype-Tissue Expression*. Available from: <http://www.gtexportal.org>
20. Beiguelman, B., *O estudo de gêmeos*. Ribeirão Preto: SBG, 2008.
21. Clayton, D., *Testing for association on the X chromosome*. Biostatistics, 2008. **9**(4): p. 593-600.
22. Clayton, D.G., *Sex chromosomes and genetic association studies*. Genome medicine, 2009. **1**(11): p. 110.
23. Xu, T., et al., *VSIG4 is highly expressed and correlated with poor prognosis of high-grade glioma patients*. American journal of translational research, 2015. **7**(6): p. 1172.
24. Liao, Y., et al., *VSIG4 expression on macrophages facilitates lung cancer development*. Laboratory investigation, 2014. **94**(7): p. 706.
25. Sturtz, L.A., et al., *Gene expression differences in adipose tissue associated with breast tumorigenesis*. Adipocyte, 2014. **3**(2): p. 107-114.
26. Textoris, J., et al., *Evaluation of current and new biomarkers in severe preeclampsia: a microarray approach reveals the VSIG4 gene as a potential blood biomarker*. PloS one, 2013. **8**(12): p. e82638.
27. Messuti, L., et al., *Joint involvement in SLE: the controversy of RHUPUS*. Int Trends Immun, 2014. **2**(4): p. 155-161.

28. Hanaoka, H., et al., *A positive direct Coombs' test in the absence of hemolytic anemia predicts high disease activity and poor renal response in systemic lupus erythematosus*. *Lupus*, 2018. **27**(14): p. 2274-2278.
29. Meulenbroek, E.M., D. Wouters, and S.S. Zeerleder, *Lyse or not to lyse: Clinical significance of red blood cell autoantibodies*. *Blood reviews*, 2015. **29**(6): p. 369-376.
30. Skare, T., et al., *Direct antiglobulin (Coombs) test in systemic lupus erythematosus patients*. *Clinical rheumatology*, 2017. **36**(9): p. 2141-2144.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of SLE patients and healthy subjects

Features ^a	SLE patients (N = 179)	Controls (N =156)	p value
Age	40 ±12,4	37 ±11,6	0.056
Sex			1.000
Male	11 (6%)	9 (6%)	
Female	168 (94%)	147 (94%)	
Female:Male	14:1	16:1	
Ethnicity			0.137
Euro	132/174 (76%)	129 (83%)	
Afro	42/174 (24%)	27 (17%)	
Juvenile SLE	25/178 (14%)		
Adult SLE	153/178 (86%)		
SLEDAI ^b	4,8±5,6		
Arthritis	41/129 (32%)		
Alopecia	31/129 (24%)		
Increase Anti-dsDNA antibodies	26/129 (20%)		
Proteinuria	22/129 (17%)		
Low serum levels (CH50, C3 or C4)	22/129 (17%)		
SLICC	1,1 ±1,3		
Neuropsychiatric	33/104 (32%)		
Kidney	31/104 (30%)		
Eye	27/104 (26%)		
Cardiovascular	18/104 (17%)		
Musculoskeletal	15/104 (14%)		
Peripheral vascular	12/104 (11%)		
Pulmonary	9/104 (9%)		
Neoplasia	9/104 (9%)		
Endocrinological	8/104 (8%)		

^aData is exhibited as mean ± SD or number (percentage);

SLE: Systemic Lupus Erythematosus

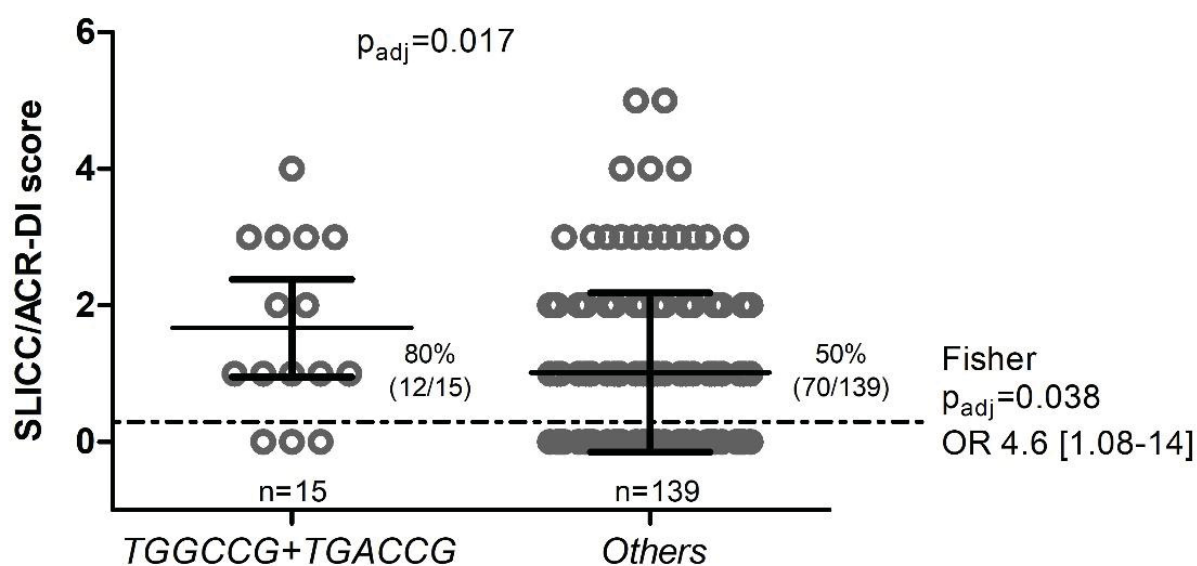
^bSLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index. Descriptive statistics were performed for all 180 patients; 129 patients exhibited a non-zero score (one or more clinical characteristics) which are displayed below in terms of populational appearance (percentage) for each clinical manifestation.

^cSLICC/ACR-DI: Systemic Lupus International Collaborating Clinics/ American College of Rheumatology – Damage Index. Descriptive statistics were performed for all 180 patients; Only 104 patients exhibited at least one permanent organ or system damage. The main permanent damages displayed at the 104 patients were identified and are expressed in terms of populational appearance (percentage) for each case.

Table 2. *VSIG4* haplotypes frequencies in patients with SLE and controls

Haplotypes	Patients N (%)	Controls N (%)	SLICC=0 N (%)	Deforming Arthritis N (%)	Diabetes N (%)	Positive Coombs N (%)	Negative Coombs N (%)	SLICC=0 vs. Deforming Arthritis p _{adj} ; OR [95%IC]	SLICC=0 vs. Diabetes p _{adj} ; OR [95%IC]	Positive vs. Negative Coombs p _{adj} ; OR [95%IC]
Female	320	216	136	24	16	22	252			
TGACTA	229 (72)	150 (70)	101 (74)	18 (75)	10 (63)	16 (73)	180 (71)	N.S.	N.S.	N.S.
TCGCCG	50 (16)	43 (20)	20 (14)	3 (13)	1 (6)	2 (9)	43 (17)	N.S.	N.S.	N.S.
TGGCCG	13 (4)	9 (4)	6 (4)	-	4 (25)	4 (18)	6 (2)	N.S.	0.008; 8.7 [1.77-42]	0.015; 5.4 [1.38-21]
TCACTA	10 (3)	6 (3)	4 (3)	1 (4)	1 (6)	-	10 (5)	N.S.	N.S.	N.S.
TCACCG	6 (2)	1 (1)	2 (2)	-	-	-	4 (2)	N.S.	N.S.	N.S.
TGGCTA	7 (2)	5 (2)	2 (2)	-	-	-	3 (1)	N.S.	N.S.	N.S.
TGACCG	5 (1)	2 (1)	1 (1)	2 (8)	-	-	6 (2)	0.041; 3.4 [1.11-87]	N.S.	N.S.
Male	10	9	2	1	0	1	5			
TGACTA	9 (90)	8 (89)	1 (50)	1 (100)	-	1 (100)	5 (100)	N.S.	N.S.	N.S.
TCGCCG	-	1 (11)	-	-	-	-	-	N.S.	N.S.	N.S.
TGGCCG	1 (10)	-	1 (50)	-	-	-	-	N.S.	N.S.	N.S.
Across both sexes	330	225	138	25	16	23	257			
TGACTA	238 (72)	158 (70)	102 (74)	19 (76)	10 (63)	17 (75)	185 (73)	N.S.	N.S.	N.S.
TCGCCG	50 (15)	44 (19)	20 (14)	3 (12)	1 (6)	2 (8)	43 (17)	N.S.	N.S.	N.S.
TGGCCG	14 (4)	9 (4)	7 (5)	-	4 (25)	4 (17)	6 (2)	N.S.	0.028; 6.6 [1.22-35]	0.010; 5.6 [1.40-20]
TCACTA	10 (3)	6 (3)	4 (2)	1 (4)	1 (6)	-	10 (4)	N.S.	N.S.	N.S.
TGGCTA	7 (2)	1 (1)	2 (1)	-	-	-	4 (1)	N.S.	N.S.	N.S.
TCACCG	6 (2)	5 (2)	2(1)	-	-	-	3 (1)	N.S.	N.S.	N.S.
TGACCG	5 (2)	2 (1)	1 (1)	2 (8)	-	-	6 (2)	0.048; 3.4 [1.01-98]	N.S.	N.S.

P values were adjusted by binary logistic regression. N.S. não significativo. N: number of chromosomes

Figure 1. SLICC/ACR-DI in patients with SLE according to the *VSIG4* haplotype.

Supplementary Material

Table 1. Primers used for *VSIG4* sequence-specific amplification

N°	Region	Position	SNP	Direction	Sequence	Fragment (pb)
1	Promoter	g.66041429	rs2284705	Fwd	5'-TGG TGT AGT GGT GAT AGG GTG T-3'	792
2				5'-TGG TGT AGT GGT GAT AGG GTG A-3'		
3		g.66040683	rs5964489	Rev	5'-TCA CTT TCT ACA ATG GCT CCA CCT C-3'	
4				5'-TCA CTT TCT ACA ATG GCT CCA CCT G-3'		
5	Intron 1	g.66033927	rs5964488	Fwd	5'-GTG ATA GAA AGA AAG TTG AGT GGC A-3'	412
6				5'-GTG ATA GAA AGA AAG TTG AGT GGC G-3'		
7	Exon 2	g.66033564	rs34581041	Rev	5'-TGA CTT CAC ACG TGT AGT GGC TCC G-3'	
8				p.Arg108Trp	5'-TGA CTT CAC ACG TGT AGT GGC TCC A-3'	
9	Intron 3	g.66029762	rs5964487	Fwd	5'-CCT CAA ACC TGT TAG AAA ACA T-3'	768
10				5'-CCT CAA ACC TGT TAG AAA ACA C-3'		
11		g.66029097	rs9887348	Rev	5'-GAC ATG AGA AAA CCA TAA GCT C-3'	
12	5'-GAC ATG AGA AAA CCA TAA GCT T-3'					

Table 2. Genotype and allele frequencies of the six *VS/G4* SNPs in SLE patients and healthy subjects.

Genotypes and alleles	SLE patients n (%)	Controls n (%)	Genotypes and alleles	SLE patients n (%)	Controls n (%)
rs2284705 (promoter)			rs34581041 (Exon 2)		
Female	N=168	N= 138	Female	N=165	N=145
TT	168 (100%)	138/138(100%)	CC	165 (100%)	136 (100%)
T	336	276	C	330	272
Male	N=11	N= 9	Male	11	N=9
T	11(100%)	9/9(100%)	C	11 (100%)	9(100%)
Across sex	N=347	N=285	Across sex	N=341	N=281
T	347 (100%)	285(100%)	C	341 (100%)	281(100%)
rs5964489 (promoter)			rs5964487 (Intron 3)		
Female	N=168	N=138	Female	N=164	N=128
GG	106 (63%)	83/138 (60%)	TT	95 (58%)	74 (58%)
GC	53(32%)	45/138 (33%)	TC	63(38%)	44 (34%)
CC	9 (5%)	10/138 (7%)	CC	6 (4%)	10 (8%)
G	265	211	T	253	192
C	71	65	C	75	64
Male	N=11	N=9	Male	N=10	N=9
G	10 (91%)	8 (89%)	T	9(90%)	8 (89%)
C	1 (9%)	1 (11%)	C	1 (10%)	1 (11%)
Across sex	N=347	N=160	Across sex	N=338	N=265
G	275 (79%)	219 (77%)	T	262 (77,5%)	200 (75,5%)
C	72(21%)	66 (23%)	C	76 (22,5%)	65(24,5%)
rs55964488 (Intron 1)			rs9887348 (Intron 3)		
Female	N=165	N=136	Female	N=164	N=128
AA	103 (62%)	79 (58%)	AA	93 (57%)	74 (58%)
AG	51 (31%)	42 (31%)	AG	64 (39%)	44 (34%)
GG	11 (7%)	15 (11%)	GG	7 (4%)	10 (8%)
A	257	200	A	250	192
G	73	72	G	78	64
Male	N=11	N=9	Male	N=10	N=9
A	9 (82%)	8 (89%)	A	9 (90%)	8 (89%)
G	2 (18%)	1 (11%)	G	1 (10%)	1 (11%)
Across sex	N=341	N=281	Across sex	N=338	N=265
A	266 (78%)	208 (74%)	A	259 (77%)	200 (75,5%)
G	75 (22%)	73 (26%)	G	79 (23%)	65 (24,5%)

5.2 ARTIGO MASP1

Polimorfismos no gene *MASP1* geram perfil de susceptibilidade na fisiopatologia do Lúpus Eritematoso Sistêmico

Resumo

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune multissistêmica que ocorre devido à formação de autoanticorpos patogênicos e complexos imunes provocando danos teciduais, no qual o sistema complemento apresenta grande influência. A participação da via clássica já está bem caracterizada, porém a via das lectinas apresenta grande importância devido sua capacidade de ativação tanto da via clássica quanto da alternativa. Poucos são os estudos nessa área. Neste trabalho objetivamos avaliar associação entre polimorfismos intrônicos do gene *MASP1* e desenvolvimento de danos permanentes em órgãos no LES. Foram analisadas amostras de DNA de 128 pacientes com LES (121 mulheres e 7 homens; 18-72 anos) e 128 controles pertencentes a mesma área geográfica pareados quanto ao sexo, idade e etnia. Avaliamos 4 polimorfismos (rs13094773; rs698105; rs3864098 e rs1108450) do gene *MASP1* através da técnica de PCR-SSP Multiplex. Os resultados obtidos mostraram que o polimorfismo *rs13094773**A está relacionado com suscetibilidade ao LES e o *rs698105**C a proteção. Já o *rs3864098**TT+CC favorece danos oculares, renais e pulmonares. O haplótipo ATCC aumenta em 20 vezes a suscetibilidade ao LES. Os dados apresentados sugerem que os SNPs analisados para o gene *MASP1* conferem um perfil de susceptibilidade ao LES, bem como o desenvolvimento de danos clínicos permanentes característicos da doença.

Introdução

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune, caracterizada pela perda de tolerância imunológica a autoantígenos e produção de autoanticorpos e complexos imunes, levando à inflamação tecidual e a danos em vários órgãos. Sua etiopatogenia envolve múltiplos genes, fatores hormonais e ambientais. É uma doença com ampla variabilidade fenotípica de apresentação, que oscila entre períodos de atividade e remissão [1,2].

A ativação do sistema complemento (SC) pode ser iniciada por três vias diferentes - vias clássica (VC), alternativa (VA) e lectina (VL) - resultando em uma cascata proteolítica, que culmina em múltiplos processos biológicos incluindo opsonização e fagocitose de microorganismos, inflamação, lise celular e remoção de complexos imunes e células apoptóticas [3, 4].

O SC exerce importante papel na fisiopatologia de LES. Por um lado, enquanto sua ativação produz mediadores inflamatórios que causam dano tecidual, por outro, protege

contra lesões através da depuração dos complexos imunes. A atuação da VC na doença já está bem caracterizada. A VL também apresenta forte influência na ativação do SC já que está intimamente ligada a ativação da VC e VA, porém necessita de mais estudos para melhor caracterizar sua atividade na doença [5,6].

A ativação da VL é mediada por serinas proteases (MASPs) associadas à lectina ligante de manose (MBL), que estão associadas às moléculas de reconhecimento de padrões (PRMs), incluindo MBL, ficolinas e colectina, que reconhecem carboidratos ou compostos acetilados em superfícies de patógenos ou células apoptóticas. Esta ativação resulta na proteólise de componentes do SC (C2 e C4) gerando a C3 convertase (C4b2a), que ativa a via comum, culminando na eliminação de moléculas estranhas [3].

Alguns estudos já correlacionam alterações na VL com doenças autoimunes. Trolborg e colaboradores (2018) observaram menor concentração sérica de MASP-3 em pacientes com LES quando comparado aos controles. Já Bini e colaboradores (2018), ao analisar o SNP *RS13094473*A* do gene *MASP1* perceberam relação com aumento na concentração sérica de MASP-1 e diminuição de MASP-3 em pacientes com pênfigo foliáceo. Neste estudo, avaliou-se polimorfismos do gene *MASP1* estão associados a suscetibilidade ou proteção em relação ao desenvolvimento do LES e a danos permanentes em órgãos específicos.

Material e métodos

Caracterização da população

Fizeram parte do estudo um total de 128 pacientes atendidos no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Evangélico de Curitiba, cujas amostras de sangue foram coletadas entre os períodos de agosto de 2011 a março de 2012 e fevereiro de 2016 a julho de 2016. O grupo controle constituiu-se de 128 amostras de adultos voluntários saudáveis que foram selecionados entre os doadores do Hemepar (Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná) e do Banco de Sangue do Hospital das Clínicas, que declararam não ter familiares com LES.

Comitê de ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos pela Universidade Evangélica do Paraná, (número CAAE 58740316.6.0000.0103) e todos os participantes voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Genotipagem do gene *MASP1*

Quatro SNPs do gene *MASP1* (ENSG00000127241) foram avaliados pelo método de reação em cadeia da polimerase sequencia específica multiplex (PCR-SSP Multiplex): *rs13094773* (A> G) localizado no intron 1, e *rs698105* (T> C), *rs3864098* (T> C) e *rs1108450* (A> C) localizados no intron 2 (Tabela 1). Dois fragmentos específicos de amplificação foram gerados, um com 731pb: para os *rs13094773* + *rs698105* e outro com 607pb: para os *rs3864098* + *rs1108450*. Um fragmento de controle de amplificação de 500 pb do gene *FCN2* foi gerado simultaneamente.

Tabela 1. Sequencias dos primers do gene *MASP1* utilizados na PCR-SSP multiplex.

dbSNP	Alelos	5' – 3' forward primer	dbSNP	Alleles	5' – 3' reverse primer	Amplicon
<i>rs13094773</i>	g.187286395A	5'AAGAGAATCAAGAGTTAAATGAA3'	<i>rs698105</i>	g.187285707G	5'CCTTGACCTGAATTCATACCA3'	731bp
	g.187286395G	5'AAGAGAATCAAGAGTTAAATGAG3'		g.187285707A	5'CCTTGACCTGAATTCATACCG3'	
<i>rs3864098</i>	g.187278072C	5'TTTAATGTCATATGTCCAACACAC3'	<i>rs1108450</i>	g.187277509A	5'ATAGGGACCCTCAAGGACCT3'	600bp
	g.187278072T	5'TTTAATGTCATATGTCCAACACAT3'		g.187277509C	5'ATAGGGACCCTCAAGGACCG3'	

pb:pares de base; dbSNP: database SNP.

A PCR foi realizada de acordo com o protocolo que utilizou 1 µL de DNA na concentração de 50 ng/µL, 25 mM de cada dNTP, 10 µM de cada primer, 50 mM de MgCl₂, 10µL tampão de PCR de 10x Coral Load com 2 corantes gel de rastreamento (Qiagen®) e 5U Polimerase Taq DNA (GoTaq® DNA Polymerase, Promega, EUA), num volume final de 15 µl. O protocolo de amplificação inicia-se com a desnaturação por 5 minutos a 95° C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos à temperatura de anelamento específico e 30 segundos a 72° C, finalizando com a etapa de extensão do DNA de duração de 5 minutos a 72° C.

Análise estatística

As frequências alélicas e genotípicas foram estimadas e comparadas por tabelas de distribuição qui-quadrado com as correções de Fisher, e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado usando o software Arlequin versão 3.1.1 e SNPStats.

A análise de regressão logística foi realizada e para a escolha do melhor modelo de herança foi utilizado-se as informações de Akaike (AIC) para minimizar a entropia esperada. A análise do desequilíbrio de ligação (LD) entre os SNPs foi calculada pelo software SNPStats. O algoritmo EM ou o método de Markov Chain Monte Carlo foi utilizado para a estimativa de haplótipos.

A análise dos haplótipos foi realizada pelo programa SNPStats que realiza a análise de associação usando os algoritmos citados quando há apenas 2 possibilidades de haplotipos, mas quando os indivíduos contribuem com mais de 2 possibilidades de haplótipos utiliza-se o algoritmo EG, e cada haplótipo assume pesos diferentes no modelo de regressão logística. A contagem dos haplótipos não é realizada de maneira direta, e a análise de regressão logística multivariada é realizada de maneira combinada com uma análise cromossômica. Os riscos para cada haplótipo é calculado dentro de categoria de referência, e toma-se o haplótipo de maior frequência como referência para os cálculos de Odds Ratio, assumindo para o mais frequente OR=1 [11].

Resultados

A idade média do grupo de pacientes foi de 39 anos, composta por 121 mulheres e 7 homens, pareados com os controles de acordo com idade, sexo e etnia. (Tabela 2).

Tabela 2. Dados demográficos de pacientes e controles

MASP1	Paciente	Controle	p
N	128	128	
Média de idade	39 (± 12)	38 (± 10)	0,43
[Min-Máx]	18-72	18-72	
Sexo (%)			1,00
Masculino	7 (5,5%)	7 (5,5%)	
Feminino	121 (94,5%)	121 (94,5%)	
Etnia (%)			0,18
Euro-brasileiro	96 (79%)	110 (86%)	
Afrodescendente	25 (21%)	18 (14%)	
Idade de início da doença (%)			
LES ^a Juvenil	20 (16%)		
LES ^a Adulto	108 (84%)		
SLEDAI^b (média)	4,8 ($\pm 5,5$)		
≤ 6 (%)	93 (73%)		
>6 (%)	35 (27%)		
SLICC/ACR-DI^c (média)	1,1 ($\pm 1,3$)		
Pulmonar (%)	6 (8%)		
Renal (%)	7 (10%)		
Ocular (%)	7 (10%)		
Cardíaca (%)	6 (8%)		
Endócrina (%)	2 (3%)		

^aLES: Lúpus Eritematoso Sistêmico;

^bSLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

^c SLICC/ACR-DI: Systemic Lupus International Colaborating Clinics/ American College of Rheumatology – Damage Index. A estatística descritiva foi realizada para todos os 128 pacientes, porém apenas 71 pacientes apresentaram pelo menos um dano permanente a órgão ou sistema. Os principais danos permanentes apresentados nos 71 pacientes foram identificados e expressos em porcentagem em relação aos 71 que apresentaram SLICC/ACR-DI positivo e são expressos em termos de aparência populacional (porcentagem) para cada caso.

A distribuição das frequências genotípicas de todos os SNPs encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos analisados. O modelo dominante foi selecionado como o melhor modelo para analisar a associação entre os SNPs e o risco de desenvolver LES.

As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos analisados em pacientes e controles são apresentadas na Tabela 3. A análise multivariada foi realizada ao longo da idade do diagnóstico de LES, gênero e etnia.

Tabela 3. Frequências de alelos e genótipos no grupo controle e pacientes com LES e associação dos SNPs analisados

dbSNP	Região	Alelos Genótipos	Controles n =128	Pacientes n =128	OR	IC (95%)	p-valor
<i>rs13094773</i>	Intron 1	g.187286395T>C					
		G	110 (0.43)	77 (0.30)	0.572	[0.40-0.82]	0.0033
		A*	146 (0.57)	179 (0.70)	1.750	[1.22-2.52]	0.0033
		A/A	44 (0.34)	66 (0.52)	2.10	[1.27-3.49]	0.0035
		A/G + G/G	85 (0.66)	62 (0.48)			
<i>rs698105</i>	Intron 2	g.187285707A>G					
		T*	44 (0.17)	71 (0.28)	1.85	[1.21-2.84]	0.0057
		C	212 (0.83)	185 (0.72)	0.54	[0.35-0.83]	0.0057
		C/C	86 (0.67)	58 (0.45)	0.40	[0.24-0.67]	0.0004
		T/C + T/T	42 (0.33)	70 (0.55)			
<i>rs3864098</i>	Intron 2	g.187278072A>G					
		T*	209 (0.82)	211 (0.82)	n.s.	n.s.	0.91
		C	47 (0.18)	45 (0.18)	n.s.	n.s.	0.91
		T/T	91 (0.71)	85 (0.66)	n.s.	n.s.	0.42
		C/T	29 (0.23)	39 (0.30)	n.s.	n.s.	
		C/C	8 (0.06)	4 (0.03)	n.s.	n.s.	
<i>rs1108450</i>	Intron 2	g.187277509T>G					
		A*	209 (0.82)	210 (0.82)	n.s.	n.s.	>0.99
		C	47 (0.18)	46 (0.18)	n.s.	n.s.	>0.99
		A/A	85 (0.66)	91 (0.71)	n.s.	n.s.	0.14
		A/C	39 (0.30)	28 (0.22)	n.s.	n.s.	
		C/C	4 (0.04)	9 (0.07)	n.s.	n.s.	

n.s. : não significativo; OR: odds ratio; IC: intervalo de confiança; dbSNP: nomenclatura de acordo com o banco de dados do Polimorfismo Único; *: alelo ancestral. Significância calculada pelo Qui-quadrado.

O *rs13094773**A mostrou-se como fator de susceptibilidade para o desenvolvimento do LES (OR=1,75 [1,22-2,52] p=0,0033), assim como o genótipo *rs13094773**AA (OR=2,10 [1,27-3,49] p=0,0035). Este alelo A corresponde ao alelo ancestral e sua frequência alélica está de acordo com a estimada para a população mundial (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?db=core;r=3:187285895-187286895;v=rs13094773;vdb=variation;vf=616053106, acesso em 01/07/2019).

Em contrapartida, o *rs698105**C e o *rs698105**CC conferem proteção para o LES (OR=0,54 [0,35-0,83] p=0,0057 e OR=0,40 [0,24-0,67] p=0,0004, respectivamente). O alelo C não é o de referência para este polimorfismo, mas apresentou proteção equivalente entre

os genótipos e, uma única cópia é suficiente para conferir o papel protetivo para o desenvolvimento do LES.

Não houve diferença estatística entre os grupos LES juvenil e LES adulto em relação aos SNPs do gene *MASP1* analisados ($p = 0,899$), e nem em relação ao SLEDAI ($p > 0,05$).

A análise entre os SNPs e os danos clínicos cumulativos (SLICC/ACR-DI) mostrou associação positiva entre o *rs3864098*TT+CC*, na qual o homocigoto, quando comparado ao heterocigoto, está associado a desenvolvimento de dano ocular (OR=5,66 [1,17-30,11], $p_{aju} = 0,017$), renal (OR=5,35 [1,19-28,33], $p_{aju} = 0,021$), e pulmonar (OR=5,81 [1,10-30,64], $p_{aju} = 0,015$). Esses danos foram representados predominantemente por catarata, proteinúria e hipertensão pulmonar, respectivamente. Alterações cardiovasculares (cardiomiopatia) foram associadas aos *rs3864098*TT+CC* e *rs1108450*AA+CC* (OR=5,57 [1,11-29,80], $p_{aju} = 0,014$ e OR=5,37 [1,30-30,6], $p_{aju} = 0,015$, respectivamente). Para alterações de natureza endócrina (diabetes) não houve associação com os SNPs ($p > 0,05$), contudo o teste de interação de tendência mostrou uma significância estatística entre a presença deste acometimento e o *rs13094773* ($p_{aju} = 0,00008$).

Houve forte desequilíbrio de ligação (LD) entre os SNPs *rs1108450_rs13094773* (LD=0,820, $r = -0,291$, $p = 3,36e-11$), *rs3864098_rs13094773* (LD=0,816, $r = -0,291$, $p = 5,35e-11$), e o *rs1108450_rs3864098*, também apresentou alto valor de correlação (LD=1,00, $r = 0,993$, $p = 2e-16$).

Dois dos seis haplótipos encontrados na população estudada mostrou associação com o desenvolvimento do LES (Tabela 4). O haplótipo ATCC confere susceptibilidade aos seus portadores (OR=20,63 [10,6-42,4] $p = 0,0000001$), por outro lado indivíduos que carregam o GCTA apresentam proteção para o LES (OR=0,444 [0,256-0,577] $p = 0,00447$).

Tabela 4. Frequência dos haplótipos genotipados nos grupos controle e LES.

Haplótipos	Frequência Haplótipica	Controles n=128	Pacientes n=128	OR[IC]; p-valor Controles vs Pacientes
ACTA	0.36	0.32	0.41	n.s.
GCTA	0.32	0.40	0.23	0.444 [0.256-0.577];
ATTA	0.11	0.10	0.12	0.00447
ACCC	0.10	0.10	0.07	n.s.
ATCC	0.08	0.07	0.10	n.s.
GTTA	0.03	0.01	0.07	20.63 [10.6-42.4]; 0.000001
				n.s.

OR [IC]: calculado por regressão logística (ajustado por idade e etnia); n.s.: não significativo

Discussão

Até o momento, este trabalho foi o primeiro estudo que analisou associação entre SNPs do gene *MASP1* e a fisiopatologia do LES. Nossos dados genéticos sugerem que as proteínas MASP-1 e MASP-3 desempenham papel fundamental no desenvolvimento do LES e na causa de danos cumulativos em órgão específicos.

Polimorfismos em regiões intrônicas possuem relação de interferência na taxa de transcrição dos genes, sendo assim, os SNPs analisados já foram associados a alterações na expressão da MASP-1 e MASP-3 [10].

Nossos dados mostram que o SNP *rs13094773*AA* aumenta em 2 vezes a chance de desenvolvimento do LES. Esse polimorfismo se localiza no intron 1 do gene *MASP1*, em uma posição de histona H3 acetilada (H3K27Ac), em uma região aberta da cromatina com expressão ativa dos transcritos. Estima-se que alterações em sítios de ligação de fatores transcricionais, em regiões de histonas acetiladas, alterem consideravelmente a taxa de transcrição do gene e/ou o transcrito a ser expresso [10]. Segundo Bini e colaboradores (2018) o alelo *rs13094473*A* foi associado a aumento na concentração sérica da MASP-1 e diminuição na concentração de MASP-3 [9]. No mesmo estudo encontrou-se papel protetivo do alelo *rs13094473*G* para o pênfigo foliáceo (PF), uma doença autoimune que causa lesões bolhosas devido o descolamento da epiderme superficial, corroborando com o resultado de risco/proteção encontrado para o LES [8, 10].

Indivíduos que carregam o genótipo *rs698105*CC* apresentam proteção para o desenvolvimento do LES, contudo o alelo *rs698105*T* possui papel de susceptibilidade para a doença. Bini e colaboradores (2018), associaram o alelo *rs698105*T* com papel de risco para o PF, pois o polimorfismo provavelmente interfere na taxa de transcrição do gene, aumentando a concentração sérica de MASP-1 e diminuindo a concentração de MASP-3.

O haplótipo *ATCC*, que carrega os 3 alelos associados às alterações de concentrações de MASP-1 (aumento) e MASP-3 (diminuição), aumenta em 20 vezes a susceptibilidade ao desenvolvimento do LES, sugerindo um papel importante na ativação do sistema complemento pelas vias alternativa (MASP-3) e das lectinas (MASP-1) na doença.

Frente ao exposto, nossa hipótese é que alterações na concentração sérica de MASP-1 e de MASP-3 são fatores importantes para o estabelecimento da fisiopatologia do LES relacionado ao SC.

Em estudo de Trodberg e colaboradores (2018), no qual foi dosado concentrações séricas de proteínas da VL e comparadas com a concentração de C3 (produto final da ativação do sistema complemento), observou-se que os pacientes com LES apresentavam concentrações séricas de C3 reduzidas quando comparadas com os controles, implicando ativação do complemento e consumo de C3, o que pode confirmar que a VL está ativada no mecanismo patogênico do LES.

Observou-se também que pacientes com nefrite lúpica apresentaram correlação negativa entre a atividade da doença, caracterizada pelo SLEDAI, e concentrações séricas de MASP-3 quando comparados aos pacientes sem a manifestação de nefrite. A literatura sugere que MASP-3, quando em alta concentração, compete com MASP-1 e MASP-2 para se ligar à MBL, inibindo a VL, por outro lado, concentrações menores de MASP-3 ativa o pró-fator D em fator D, dando seguimento a VA [6].

No presente trabalho, os achados genéticos (haplótipo *ATCC*) indicam que os polimorfismos estudados possam contribuir de maneira significativa nas alterações de concentrações séricas evidenciadas por Trodberg (2018), levantando a hipótese de que baixas concentrações de MASP-3, por ativarem a VA, causam danos em órgãos específicos, como por exemplo na nefrite lúpica. Essa hipótese sugere um papel ativo, porém ainda desconhecido da MASP-3 no desenvolvimento do LES, pois o papel desta proteína ainda é pouco investigado na fisiopatologia desta doença.

Já concentrações séricas aumentadas de MASP-1 também podem contribuir para os danos cumulativos por ativarem maior quantidade de MASP-2 e estimular o processo inflamatório através da ativação da VL.

Outro estudo, também envolvendo a população dinamarquesa, apresentou correlação com diminuição da concentração de MASP-3 e aumento da gravidade da inflamação glomerular em pacientes com NlgA (nefropatia mediada por depósito de anticorpo imunoglobulina A). No mesmo trabalho, pacientes com nefrite lúpica apresentaram altas concentrações de MASP-1 e baixas de MASP-3. Além disso, pacientes com baixas concentrações de MASP-3 apresentaram doença renal progressiva e instabilidade dos níveis sorológicos da proteína [6]. Tais achados corroboram com a hipótese anterior de que alta concentração de MASP-1 potencializa a VL e que a baixa concentração de MASP-3 potencializa a VA, que apresenta forte relação com desenvolvimento de dano renal [6].

Entretanto, nenhuma investigação genética foi realizada pelo grupo dinamarquês. Nossos dados sugerem papel importante dos SNPs de *MASP1* analisados no fenótipo já evidenciado por esses pesquisadores. Outro ponto que suporta nossa hipótese, é que as alterações renais graves que foram correlacionadas com alterações dos níveis de MASP-1 e MASP-3 nos estudos dinamarqueses, também foram associadas neste presente estudo com presença de dano renal permanente. Além de danos renais, observou-se também associação com acometimentos ocular, pulmonar e cardíaco. Entretanto, até o momento, nenhum trabalho realizou análise de concentrações séricas para essas manifestações clínicas.

Uma fundamentada justificativa para tais resultados, se dá pelo fato de que a via alternativa do SC pode ser ativada pela MASP-3, quando em baixa concentrações, potencializando o processo inflamatório e dano tecidual, principalmente renal. Concomitantemente, a via das lectinas é ativada pela alta concentração de MASP-1 e fracamente regulada pela baixa concentração de MASP-3, levando a uma ativação exacerbada desta via que contribui para a amplificação da cascata do sistema complemento e aumento da deposição de C3 nos tecidos [3, 4, 6, 8].

Os dados deste trabalho devem ser tomados com cautela devido às limitações apresentadas, uma vez que não foi realizado a quantificação dos níveis séricos de MASP-1 e MASP-3 nos pacientes com os genótipos associados e sua limitação amostral.

Conclui-se que os SNPs analisados no gene *MASP1* neste trabalho conferem um perfil de susceptibilidade ao LES, bem como o desenvolvimento de danos cumulativos característicos da doença.

Referências

1. Sawada, T., D. Fujimori, and Y. Yamamoto, *Systemic lupus erythematosus and immunodeficiency*. Immunological medicine, 2019. **42**(1): p. 1-9.
2. La Paglia, G.M.C., et al., *One year in review 2017: systemic lupus erythematosus*. Clin Exp Rheumatol, 2017. **35**(4): p. 551-561.
3. Andrade, F.A., et al., *Serine proteases in the lectin pathway of the complement system*, in *Proteases in Physiology and Pathology*. 2017, Springer. p. 397-420.
4. Boldt, A.B.W. and M.L. Petzl-Erler, *A new strategy for mannose-binding lectin gene haplotyping*. Human mutation, 2002. **19**(3): p. 296-306.

5. Picelli, V.F., *Estudo da via alternativa do sistema complemento e de doenças autoimunes associadas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico*. 2013.
6. Medjeral-Thomas, N.R., et al., *Progressive IgA Nephropathy Is Associated With Low Circulating Mannan-Binding Lectin–Associated Serine Protease-3 (MASP-3) and Increased Glomerular Factor H–Related Protein-5 (FHR5) Deposition*. *Kidney international reports*, 2018. **3**(2): p. 426-438.
7. Troldborg, A., et al., *The lectin pathway of complement activation in patients with systemic lupus erythematosus*. *The Journal of rheumatology*, 2018. **45**(8): p. 1136-1144.
8. Bumiller-Bini, V., et al., *Sparking fire under the skin? Answers from the association of complement genes with pemphigus foliaceus*. *Frontiers in immunology*, 2018. **9**: p. 695.
9. GTEx, *Genotype-Tissue Expression*. Available from: <http://www.gtexportal.org>
10. Genome, Available from: <https://genome.ucsc.edu/>
11. Solé, X., et al., *SNPStats: a web tool for the analysis of association studies*. *Bioinformatics*, 2006. **22**(15): p. 1928-1929.

6. Conclusão

-Houve associação entre o haplótipo *VSIG4 TGGCCG* com a manifestação de diabetes e positividade para o teste de Coombs em mulheres com LES;

-Houve associação entre o haplótipo *VSIG4 TGACCG* e a manifestação de artrite deformante em mulheres com LES;

-Os haplótipos *VSIG4 TGGCCG+TGACCG* também foram associados a maior média no escore de dano cumulativo (SLICC/ACR-DI) em mulheres com LES;

-A maioria dos pacientes que carregam os haplótipos *VSIG4 TGGCCG+TGACCG* apresentaram pelo menos um dano cumulativo (SLICC/ACR-DI);

-A análise *in silico* indicou que o SNP *rs5964489* (região promotora) possivelmente influencia na expressão do gene *VSIG4* enquanto os alelos SNPs *rs5964487C* e *rs9887348G* estão em delequilibrium absoluto com o alelo *rs41306131A* do gene *VSIG4*, previsto para apresenta impacto funcional com um provável efeito deletério na função de CRlg;

-Nossos resultados indicam que polimorfismos do gene *VSIG4* podem contribuir para o maior escore de dano cumulativo, manifestação de artrite deformante e diabetes, bem como positividade do teste de Coombs em mulheres com LES;

-Houve associação do genótipo *rs13094773*AA* do gene *MASP1* com chance aumentada em duas vezes de desenvolvimento de LES;

- Houve associação do genótipo *rs698105*CC* do gene *MASP1* com proteção ao LES;

- Houve associação do alelo *rs698105*T* do gene *MASP1* com susceptibilidade para LES;

-Houve associação do haplótipo *ATCC* do gene *MASP1* com susceptibilidade aumentada em 20 vezes para o desenvolvimento de LES;

-Houve associação dos genótipos *rs3864098*TT+CC*, com dano cumulativo para sistemas renal, pulmonar e ocular;

-Houve associação dos genótipos *rs3864098*TT+CC* e *rs1108450*AA+CC*, com dano cumulativo para sistema cardiovascular;

-Os SNPs analisados neste trabalho no gene *MASP1* conferem um perfil de susceptibilidade ao LES, bem como o desenvolvimento de danos cumulativos característicos da doença.

- Não foi observada associação significativa entre os alelos/genótipos dos SNPs estudados de *VSIG4* e *MASP1* e a atividade da doença (SLEDAI);

-Não foi observada associação significativa entre os alelos/genótipos dos SNPs estudados de *VSIG4* e *MASP1* com a susceptibilidade ao desenvolvimento de LES juvenil e LES adulto;

-Não foi observada associação significativa entre os alelos/genótipos dos SNPs estudados de *VSIG4* e a susceptibilidade ao LES;

-Não foi observada associação significativa entre os alelos/genótipos SNPs estudados de *VSIG4* com o perfil e escore do dano cumulativo (SLICC/ACR-DI) em pacientes com LES;

-Não foi observada associação significativa entre os alelos/genótipos SNPs estudados de *VSIG4* e o perfil de autoanticorpos em pacientes com LES;

7. REFERÊNCIAS

Abbas, A. H., F. I. Gorial, M. H. Al-Osami, A. H. Ad'hiah and A. K. Melconian "The etiological role of Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae infections in systemic lupus erythematosus of Iraqi female patients."

Abdwani, R. and R. Mani (2009). "Anti-CD20 monoclonal antibody in acute life threatening haemolytic anaemia complicating childhood onset SLE." Lupus **18**(5): 460-464.

Ahluwalia, J. and A. Marsch (2019). "Photosensitivity and photoprotection in patients with lupus erythematosus." Lupus **28**(6): 697-702.

Alegretti, A. P. (2011). "Correlação entre o nível de expressão de CD55/CD59/CD46/CD35 e a presença de citopenias em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico."

Amano, M. T., V. P. L. Ferriani, M. P. C. Florido, E. S. Reis, M. I. M. V. Delcolli, A. E. C. S. Azzolini, A. I. Assis-Pandochi, A. G. Sjöholm, C. S. Farah and J. C. Jensenius (2008). "Genetic analysis of complement C1s deficiency associated with systemic lupus erythematosus highlights alternative splicing of normal C1s gene." Molecular immunology **45**(6): 1693-1702.

Ambrus, G., P. Gál, M. Kojima, K. Szilágyi, J. Balczer, J. Antal, L. Gráf, A. Laich, B. E. Moffatt and W. Schwaeble (2003). "Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and-2: a study on recombinant catalytic fragments." The Journal of Immunology **170**(3): 1374-1382.

Ammitzbøll, C. G., R. Steffensen, H. J. Nielsen, S. Thiel, K. Stengaard-Pedersen, M. Bøgsted and J. C. Jensenius (2013). "Polymorphisms in the MASP1 gene are associated with serum levels of MASP-1, MASP-3, and MASP44." PloS one **8**(9): e73317.

Andrade, F. A., K. C. F. Lidani, S. J. Catarino and I. J. Messias-Reason (2017). Serine proteases in the lectin pathway of the complement system. Proteases in Physiology and Pathology, Springer: 397-420.

Arora, V., R. Grover, A. Kumar, D. Anand and N. Das (2011). "Relationship of leukocyte CR1 transcript and protein with the pathophysiology and prognosis of systemic lupus erythematosus: a follow-up study." Lupus **20**(10): 1010-1018.

Arora, V., J. Verma, R. Dutta, V. Marwah, A. Kumar and N. Das (2004). "Reduced complement receptor 1 (CR1, CD35) transcription in systemic lupus erythematosus." Molecular immunology **41**(4): 449-456.

Arumugam, T. V., T. Magnus, T. M. Woodruff, L. M. Proctor, I. A. Shiels and S. M. Taylor (2006). "Complement mediators in ischemia-reperfusion injury." Clinica Chimica Acta **374**(1-2): 33-45.

Atik, T., A. Koparir, G. Bademci, J. Foster, U. Altunoglu, G. Y. Mutlu, S. Bowdin, N. Elcioglu, G. A. Tayfun and S. S. Atik (2015). "Novel MASP1 mutations are associated with an expanded phenotype in 3MC1 syndrome." Orphanet journal of rare diseases **10**(1): 128.

Bao, L., M. Haas and R. J. Quigg (2011). "Complement factor H deficiency accelerates development of lupus nephritis." Journal of the American Society of Nephrology **22**(2): 285-295.

Bao, L. and R. J. Quigg (2007). Complement in lupus nephritis: the good, the bad, and the unknown. Seminars in nephrology, Elsevier.

Barzilai, O., Y. Sherer, M. Ram, D. Izhaky, J. M. Anaya and Y. Shoenfeld (2007). "Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in autoimmune diseases: are they truly notorious? A preliminary report." Annals of the New York Academy of Sciences **1108**(1): 567-577.

Beltrame, M. H., A. B. W. Boldt, S. J. Catarino, H. C. Mendes, S. E. Boschmann, I. Goeldner and I. Messias-Reason (2015). "MBL-associated serine proteases (MASPs) and infectious diseases." Molecular immunology **67**(1): 85-100.

Beltrame, M. H., S. J. Catarino, I. Goeldner, A. B. W. Boldt and I. J. de Messias-Reason (2015). "The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease." Frontiers in pediatrics **2**: 148.

Bennet, W., B. Sundberg, T. Lundgren, A. Tibell, C.-G. Groth, A. Richards, D. J. White, G. Elgue, R. Larsson and B. Nilsson (2000). "Damage to porcine islets of Langerhans after exposure to human blood in vitro, or after intraportal transplantation to cynomolgus monkeys: protective effects of sCR1 and Heparin1." Transplantation **69**(5): 711-719.

Bertsias, G. K., J. P. A. Ioannidis, J. Boletis, S. Bombardieri, R. Cervera, C. Dostal, J. Font, I. M. Gilboe, F. Houssiau and T. Huizinga (2008). "EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics." Annals of the rheumatic diseases **67**(2): 195-205.

Bezerra, E. L. M., M. J. P. Vilar, O. d. F. C. Barbosa, S. Q. Santos, M. D. A. Castro, M. C. D. Trindade and E. I. Sato (2005). "Lúpus eritematoso sistêmico (LES): perfil clínico-laboratorial dos pacientes do Hospital Universitário Onofre Lopes (UFRN-Natal/Brasil) e índice de dano nos pacientes com diagnóstico recente." Revista Brasileira de Reumatologia.

Brown, K. S., S. D. Ryder, W. L. Irving, R. B. Sim and T. P. Hickling (2007). "Mannan binding lectin and viral hepatitis." Immunology letters **108**(1): 34-44.

Budhram, A., J. Yuen, H. Yan and M. Kremenutzky (2016). Is it ever lupus? A single centre retrospective review of the rheumatologic work-up in patients with clinically isolated syndrome (P6. 113), AAN Enterprises.

Buyon, J. P., M. A. Petri, M. Y. Kim, K. C. Kalunian, J. Grossman, B. H. Hahn, J. T. Merrill, L. Sammaritano, M. Lockshin and G. S. Alarcón (2005). "The effect of combined estrogen and progesterone hormone replacement therapy on disease activity in systemic lupus erythematosus: a randomized trial." Annals of internal medicine **142**(12_Part_1): 953-962.

Ceribelli, A., L. Andreoli, I. Cavazzana, F. Franceschini, A. Radice, L. Rimoldi, R. A. Sinico, M. Carlsson, J. Wieslander and A. Tincani (2009). "Complement Cascade in Systemic Lupus Erythematosus." Annals of the New York Academy of Sciences **1173**(1): 427.

Chang, D. M., J. L. Lan, H. Y. Lin and S. F. Luo (2002). "Dehydroepiandrosterone treatment of women with mild-to-moderate systemic lupus erythematosus: A multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled trial." Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology **46**(11): 2924-2927.

Chen, K. L., R. L. Krain and V. P. Werth (2019). "Advancing understanding, diagnosis, and therapies for cutaneous lupus erythematosus within the broader context of systemic lupus erythematosus." F1000Research **8**.

Cortesio, C. L. and W. Jiang (2006). "Mannan-binding lectin-associated serine protease 3 cleaves synthetic peptides and insulin-like growth factor-binding protein 5." Archives of biochemistry and biophysics **449**(1-2): 164-170.

da Rosa Utiyama, S. R., L. M. da Silva Kotze and I. T. de Messias Reason (2005). "Complement factor B allotypes in the susceptibility and severity of coeliac disease in patients and relatives." International journal of immunogenetics **32**(5): 307-314.

Davies, E. J., M. C. Hillarby, R. G. Cooper, E. M. Hay, J. R. Green, S. Shah, R. M. Bernstein, P. J. L. Holt and D. M. Grennan (1993). "HLA-DQ, DR and complement C4 variants in systemic lupus erythematosus." Rheumatology **32**(10): 870-875.

Degn, S. E., J. C. Jensenius and M. Bjerre (2011). "The lectin pathway and its implications in coagulation, infections and auto-immunity." Current opinion in organ transplantation **16**(1): 21-27.

Di Battista, M., E. Marcucci, E. Elefante, A. Tripoli, G. Governato, D. Zucchi, C. Tani and A. Alunno (2018). "One year in review 2018: systemic lupus erythematosus." Clin Exp Rheumatol **36**(5): 763-777.

Dobó, J., B. Major, K. A. Kékesi, I. Szabó, M. Megyeri, K. Hajela, G. Juhász, P. Závodszy and P. Gál (2011). "Cleavage of kininogen and subsequent bradykinin release by the complement component: mannose-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1." PloS one **6**(5): e20036.

Durcan, L., T. O'Dwyer and M. Petri (2019). "Management strategies and future directions for systemic lupus erythematosus in adults." The Lancet **393**(10188): 2332-2343.

Dykman, T. R., J. L. Cole, K. Iida and J. P. Atkinson (1983). "Polymorphism of human erythrocyte C3b/C4b receptor." Proceedings of the National Academy of Sciences **80**(6): 1698-1702.

Dykman, T. R., J. A. Hatch and J. P. Atkinson (1984). "Polymorphism of the human C3b/C4b receptor. Identification of a third allele and analysis of receptor phenotypes in families and patients with systemic lupus erythematosus." Journal of Experimental Medicine **159**(3): 691-703.

Edelbauer, M., S. Kshirsagar, M. Riedl, D. Haffner, H. Billing, B. Tönshoff, S. Ross, J. Dötsch, O. Amon and H. Fehrenbach (2011). "Markers of childhood lupus nephritis indicating disease activity." Pediatric Nephrology **26**(3): 401-410.

Fava, A. and M. Petri (2018). "Systemic lupus erythematosus: diagnosis and clinical management." Journal of autoimmunity.

Fonseca, S. B. (2011). "Lúpus eritematoso sistêmico: causas, mecanismos patológicos e alvos terapêuticos futuros."

Fraser, I. P., H. Koziel and R. A. B. Ezekowitz (1998). The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. Seminars in immunology, Elsevier.

Frauenknecht, V., S. Thiel, L. Storm, N. Meier, M. Arnold, J. P. Schmid, H. Saner and V. Schröder (2013). "Plasma levels of mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASP s) and MBL-associated protein in cardio-and cerebrovascular diseases." Clinical & Experimental Immunology **173**(1): 112-120.

Freire, E. A. M., L. M. Souto and R. M. Ciconelli (2011). "Medidas de avaliação em lúpus eritematoso sistêmico." Revista Brasileira de Reumatologia.

Generali, E., A. Ceribelli, M. A. Stazi and C. Selmi (2017). "Lessons learned from twins in autoimmune and chronic inflammatory diseases." Journal of autoimmunity **83**: 51-61.

Ghodke-Puranik, Y. and T. B. Niewold (2015). "Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: a comprehensive review." Journal of autoimmunity **64**: 125-136.

Gladman, D. D., D. Ibanez and M. B. Urowitz (2002). "Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000." The Journal of rheumatology **29**(2): 288-291.

Goldman, L. and A. I. Schafer (2018). Goldman-Cecil Medicina: Adaptado à realidade brasileira, Elsevier Brasil.

Gorgani, N. N., U. Thathaisong, V. R. S. Mukaro, O. Pongpair, A. Tirimacco, C. S. T. Hii and A. Ferrante (2011). "Regulation of CRIg expression and phagocytosis in human

macrophages by arachidonate, dexamethasone, and cytokines." The American journal of pathology **179**(3): 1310-1318.

Gregory, L. A., N. M. Thielens, M. Matsushita, R. Sorensen, G. J. Arlaud, J. C. Fontecilla-Camps and C. Gaboriaud (2004). "The X-ray structure of human mannan-binding lectin-associated protein 19 (MAp19) and its interaction site with mannan-binding lectin and L-ficolin." Journal of Biological Chemistry **279**(28): 29391-29397.

Griffiths, B., M. Mosca and C. Gordon (2005). "Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices." Best practice & research Clinical rheumatology **19**(5): 685-708.

Helmy, K. Y., K. J. Katschke Jr, N. N. Gorgani, N. M. Kljavin, J. M. Elliott, L. Diehl, S. J. Scales, N. Ghilardi and M. van Lookeren Campagne (2006). "CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens." Cell **124**(5): 915-927.

Hess, K., R. Ajjan, F. Phoenix, J. Dobó, P. Gál and V. Schroeder (2012). "Effects of MASP-1 of the complement system on activation of coagulation factors and plasma clot formation." PloS one **7**(4): e35690.

Hisano, S., M. Matsushita, T. Fujita, M. Takeshita and H. Iwasaki (2007). "Activation of the lectin complement pathway in post-streptococcal acute glomerulonephritis." Pathology international **57**(6): 351-357.

Hochberg, M. C. (1997). "Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus." Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology **40**(9): 1725-1725.

Ingels, C., I. Vanhorebeek, R. Steffensen, I. Derese, L. Jensen, P. J. Wouters, G. Hermans, S. Thiel and G. Van den Berghe (2014). "Lectin pathway of complement activation and relation with clinical complications in critically ill children." Pediatric research **75**(1-1): 99.

Jani, P. K., E. Kajdacs, M. Megyeri, J. Dobó, Z. Doleschall, K. Futosi, C. I. Tímár, A. Mocsai, V. Mako and P. Gal (2014). "MASP-1 induces a unique cytokine pattern in endothelial cells: a novel link between complement system and neutrophil granulocytes." PloS one **9**(1): e87104.

Kakuta, K., K. Dohi, Y. Sato, T. Yamanaka, M. Kawamura, T. Ogura, S. Nakamori, N. Fujimoto, E. Fujii and N. Yamada (2016). "Chronic inflammatory disease is an independent risk factor for coronary flow velocity reserve impairment unrelated to the processes of coronary artery calcium deposition." Journal of the American Society of Echocardiography **29**(2): 173-180.

Karamelic, J., D. Subasic, M. Kasumovic, H. Hodzic, L. Prljaca-Zececic, M. Tufekcic and I. Aganovic-Musinovic (2010). "Clinical management of patients with systemic lupus

erythematosus (SLE) with different C1q-C1C and C3 concentrations." Medical Archives **64**(2): 75.

Katschke, K. J., K. Y. Helmy, M. Steffek, H. Xi, J. Yin, W. P. Lee, P. Gribling, K. H. Barck, R. A. D. Carano and R. E. Taylor (2007). "A novel inhibitor of the alternative pathway of complement reverses inflammation and bone destruction in experimental arthritis." Journal of Experimental Medicine **204**(6): 1319-1325.

Kim, K., S.-Y. Bang, D. H. Yoo, S.-K. Cho, C.-B. Choi, Y.-K. Sung, T.-H. Kim, J.-B. Jun, Y. M. Kang and C.-H. Suh (2016). "Imputing variants in HLA-DR beta genes reveals that HLA-DRB1 is solely associated with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus." PloS one **11**(2): e0150283.

Kjaer, T. R., S. Thiel and G. R. Andersen (2013). "Toward a structure-based comprehension of the lectin pathway of complement." Molecular immunology **56**(4): 413-422.

Kluger, M. A., S. Melderis, A. Nosko, B. Goerke, M. Luig, M. C. Meyer, J.-E. Turner, C. Meyer-Schwesinger, C. Wegscheid and G. Tiegs (2016). "Treg17 cells are programmed by Stat3 to suppress Th17 responses in systemic lupus." Kidney international **89**(1): 158-166.

Klumb, E. M., C. A. A. Silva, C. C. D. Lanna, E. I. Sato, E. F. Borba, J. C. T. Brenol, E. M. d. N. d. Albuquerque, O. A. Monticelo, L. T. L. Costallat and L. C. Latorre (2015). "Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for the diagnosis, management and treatment of lupus nephritis." Revista brasileira de reumatologia **55**(1): 1-21.

Korbie, D. J. and J. S. Mattick (2008). "Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification." Nature protocols **3**(9): 1452.

Kremlitzka, M., B. Mácsik-Valent, A. Polgár, E. Kiss, G. Poór and A. Erdei (2016). "Complement receptor type 1 suppresses human B cell functions in SLE patients." Journal of immunology research **2016**.

Kremlitzka, M., A. Polgár, L. Fülöp, E. Kiss, G. Poór and A. Erdei (2012). "Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a potent inhibitor of B-cell functions in rheumatoid arthritis patients." International immunology **25**(1): 25-33.

Kuo, C.-F., M. J. Grainge, A. M. Valdes, L.-C. See, S.-F. Luo, K.-H. Yu, W. Zhang and M. Doherty (2015). "Familial aggregation of systemic lupus erythematosus and coaggregation of autoimmune diseases in affected families." JAMA internal medicine **175**(9): 1518-1526.

La Paglia, G. M. C., M. C. Leone, G. Lepri, R. Vagelli, E. Valentini, A. Alunno and C. Tani (2017). "One year in review 2017: systemic lupus erythematosus." Clin Exp Rheumatol **35**(4): 551-561.

Langnaese, K., L. Colleaux, D. U. Kloos, M. Fontes and P. Wieacker (2000). "Cloning of Z39Ig, a novel gene with immunoglobulin-like domains located on human chromosome X." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression **1492**(2-3): 522-525.

Lee, L. A. and V. P. Werth (2012). "Lupus erythematosus." Dermatology **2**(3): 615-629.

Li, D., P. Yang, Q. Xiong, X. Song, X. Yang, L. Liu, W. Yuan and Y.-C. Rui (2010). "MicroRNA-125a/b-5p inhibits endothelin-1 expression in vascular endothelial cells." Journal of hypertension **28**(8): 1646-1654.

Liao, Y., S. Guo, Y. Chen, D. Cao, H. Xu, C. Yang, L. Fei, B. Ni and Z. Ruan (2014). "VSIG4 expression on macrophages facilitates lung cancer development." Laboratory investigation **94**(7): 706.

Lieberman, L. A., M. Mizui, A. Nalbandian, R. Bossé, J. C. Crispín and G. C. Tsokos (2015). "Complement receptor of the immunoglobulin superfamily reduces murine lupus nephritis and cutaneous disease." Clinical Immunology **160**(2): 286-291.

Lin, W., D. Seshasayee, W. P. Lee, P. Caplazi, S. McVay, E. Suto, A. Nguyen, Z. Lin, Y. Sun and L. DeForge (2015). "Dual B cell immunotherapy is superior to individual anti-CD20 depletion or BAFF blockade in murine models of spontaneous or accelerated lupus." Arthritis & Rheumatology **67**(1): 215-224.

Lins, C. F. and M. B. Santiago (2015). "Ultrasound evaluation of joints in systemic lupus erythematosus: a systematic review." European radiology **25**(9): 2688-2692.

Lonsdale, J., J. Thomas, M. Salvatore, R. Phillips, E. Lo, S. Shad, R. Hasz, G. Walters, F. Garcia and N. Young (2013). "The genotype-tissue expression (GTEx) project." Nature genetics **45**(6): 580.

Lood, C., S. Eriksson, B. Gullstrand, A. Jönsen, G. Sturfelt, L. Truedsson and A. A. Bengtsson (2012). "Increased C1q, C4 and C3 deposition on platelets in patients with systemic lupus erythematosus—a possible link to venous thrombosis?" Lupus **21**(13): 1423-1432.

Lord, J. and K. Morgan (2013). Complement Component (3b/4b) Receptor 1 (CR1). Genetic Variants in Alzheimer's Disease, Springer: 77-101.

Lundberg, I. E., A. Tjärnlund, M. Bottai, V. P. Werth, C. Pilkington, M. de Visser, L. Alfredsson, A. A. Amato, R. J. Barohn and M. H. Liang (2017). "2017 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for adult and juvenile idiopathic inflammatory myopathies and their major subgroups." Arthritis & Rheumatology **69**(12): 2271-2282.

Ma, Y., K. Usuwanthim, U. Munawara, A. Quach, N. N. Gorgani, C. A. Abbott, C. S. Hii and A. Ferrante (2015). "Protein kinase C α regulates the expression of complement receptor Ig in human monocyte-derived macrophages." The Journal of Immunology **194**(6): 2855-2861.

Macedo, A. C. L. and L. Isaac (2016). "Systemic lupus erythematosus and deficiencies of early components of the complement classical pathway." Frontiers in immunology **7**: 55.

Medjeral-Thomas, N. R., A. Troldborg, N. Constantinou, H. J. Lomax-Browne, A. G. Hansen, M. Willicombe, C. D. Pusey, H. T. Cook, S. Thiel and M. C. Pickering (2018). "Progressive IgA Nephropathy Is Associated With Low Circulating Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Protease-3 (MASP-3) and Increased Glomerular Factor H-Related Protein-5 (FHR5) Deposition." Kidney international reports **3**(2): 426-438.

Mocarzel, L. O. C., P. G. Lanzieri, R. A. Montes, R. A. O. C. Gismondi and C. T. Mesquita (2015). "Lúpus eritematoso sistêmico: revisão das manifestações cardiovasculares." Int J Cardiovasc Sci **28**(3): 251-261.

Nath, S. K., J. Kilpatrick and J. B. Harley (2004). "Genetics of human systemic lupus erythematosus: the emerging picture." Current opinion in immunology **16**(6): 794-800.

O'Neill, S. G. and L. Schrieber (2005). "Immunotherapy of systemic lupus erythematosus." Autoimmunity reviews **4**(6): 395-402.

Pacheco, Y., J. Barahona-Correa, D. M. Monsalve, Y. Acosta-Ampudia, M. Rojas, Y. Rodríguez, J. Saavedra, M. Rodríguez-Jiménez, R. D. Mantilla and C. Ramirez-Santana (2017). "Cytokine and autoantibody clusters interaction in systemic lupus erythematosus." Journal of translational medicine **15**(1): 239.

Park, J., K. Raymond, M. White and A. Joshi (2019). 50 Patient insights of fatigue in systemic lupus erythematosus and content validation of the FACIT-Fatigue, Archives of Disease in childhood.

Petri, M., A. M. Orbai, G. S. Alarcon, C. Gordon, J. T. Merrill, P. R. Fortin, I. N. Bruce, D. Isenberg, D. J. Wallace and O. Nived (2012). "Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus." Arthritis & Rheumatism **64**(8): 2677-2686.

Picelli, V. F. (2013). "Estudo da via alternativa do sistema complemento e de doenças autoimunes associadas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico."

Quintanilla-González, L., Y. Atisha-Fregoso, L. Llorente and H. Fragoso-Loyo (2017). "Myelitis in systemic lupus erythematosus: clinical characteristics and effect in accrual damage. A single-center experience." Lupus **26**(3): 248-254.

Roman, M. J., J. E. Salmon, R. Sobel, M. D. Lockshin, L. Sammaritano, J. E. Schwartz and R. B. Devereux (2001). "Prevalence and relation to risk factors of carotid atherosclerosis

and left ventricular hypertrophy in systemic lupus erythematosus and antiphospholipid antibody syndrome." American Journal of Cardiology **87**(5): 663-666.

Rooryck, C., A. Diaz-Font, D. P. S. Osborn, E. Chabchoub, V. Hernandez-Hernandez, H. Shamseldin, J. Kenny, A. Waters, D. Jenkins and A. Al Kaissi (2011). "Mutations in lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome." Nature genetics **43**(3): 197.

Rozenendaal, R. and M. C. Carroll (2006). "Emerging patterns in complement-mediated pathogen recognition." Cell **125**(1): 29-32.

Sarma, J. V. and P. A. Ward (2011). "The complement system." Cell and tissue research **343**(1): 227-235.

Sato, T., Y. Endo, M. Matsushita and T. Fujita (1994). "Molecular characterization of a novel serine protease involved in activation of the complement system by mannose-binding protein." International immunology **6**(4): 665-669.

Sawada, T., D. Fujimori and Y. Yamamoto (2019). "Systemic lupus erythematosus and immunodeficiency." Immunological medicine **42**(1): 1-9.

Schneider, L., A. P. Alegretti, A. K. Piccoli, O. A. Monticelo, P. S. Lora, L. Schneider, J. C. T. Brenol and R. M. Xavier (2012). "Correlação entre o nível de expressão de CD55, CD59, CD46 E CD35 e a presença de citopenias em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico." Revista HCPA. Porto Alegre.

Sekine, H., P. Ruiz, G. S. Gilkeson and S. Tomlinson (2011). "The dual role of complement in the progression of renal disease in NZB/W F1 mice and alternative pathway inhibition." Molecular immunology **49**(1-2): 317-323.

Shoenfeld, Y., G. Zandman-Goddard, L. Stojanovich, M. Cutolo, H. Amital, Y. Levy, M. Abu-Shakra, O. Barzilai, Y. Berkun and M. Blank (2008). "The mosaic of autoimmunity: hormonal and environmental factors involved in autoimmune diseases--2008." The Israel Medical Association Journal **10**(1): 8.

Sirmaci, A., T. Walsh, H. Akay, M. Spiliopoulos, Y. B. Şakalar, A. Hasanefendioğlu-Bayrak, D. Duman, A. Farooq, M.-C. King and M. Tekin (2010). "MASP1 mutations in patients with facial, umbilical, coccygeal, and auditory findings of Carnevale, Malpuech, OSA, and Michels syndromes." The American Journal of Human Genetics **87**(5): 679-686.

Skjoedt, M.-O., T. Hummelshoj, Y. Palarasah, C. Honore, C. Koch, K. Skjodt and P. Garred (2010). "A novel mannose-binding lectin/ficolin-associated protein is highly expressed in heart and skeletal muscle tissues and inhibits complement activation." Journal of Biological Chemistry **285**(11): 8234-8243.

Skjoedt, M.-O., Y. Palarasah, L. Munthe-Fog, Y. J. Ma, G. Weiss, K. Skjodt, C. Koch and P. Garred (2010). "MBL-associated serine protease-3 circulates in high serum concentrations predominantly in complex with Ficolin-3 and regulates Ficolin-3 mediated complement activation." Immunobiology **215**(11): 921-931.

Small, A. G., M. Al-Baghdadi, A. Quach, C. Hii and A. Ferrante (2016). "Complement receptor immunoglobulin: a control point in infection and immunity, inflammation and cancer." Swiss medical weekly **146**(1314).

Smykał-Jankowiak, K. and Z. I. Niemir (2009). "Structure and function of complement protein C1q and its role in the development of autoimmune diseases." Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online) **63**: 134-141.

Song, D., W.-y. Guo, F.-m. Wang, Y.-z. Li, Y. Song, F. Yu and M.-h. Zhao (2017). "Complement Alternative Pathway' s Activation in Patients With Lupus Nephritis." The American journal of the medical sciences **353**(3): 247-257.

Song, H., F. Fang, G. Tomasson, F. K. Arnberg, D. Mataix-Cols, L. F. de la Cruz, C. Almqvist, K. Fall and U. A. Valdimarsdóttir (2018). "Association of stress-related disorders with subsequent autoimmune disease." Jama **319**(23): 2388-2400.

Sontheimer, R. D. (2005). "Subacute cutaneous lupus erythematosus: 25-year evolution of a prototypic subset (subphenotype) of lupus erythematosus defined by characteristic cutaneous, pathological, immunological, and genetic findings." Autoimmunity reviews **4**(5): 253-263.

Stinghen, S. T. (2015). "Polimorfismos do gene VSIG4 em pacientes com hanseníase e coinfeção com hepatite B de Curitiba-PR e Sinop-MT."

Tani, C., R. Vagelli, C. Stagnaro, L. Carli, V. Lorenzoni, F. Drago, W. Doherty, M. R. McSorley, L. Marconcini and A. Della Rossa (2018). "Translation, cultural adaptation and validation of the Systemic Lupus Erythematosus Activity Questionnaire (SLAQ) in a cohort of Italian systemic lupus erythematosus patients." Lupus **27**(10): 1735-1741.

Thielens, N. M., K. Enrie, M. Lacroix, M. Jaquinod, J.-F. Hernandez, A. F. Esser and G. J. Arlaud (1999). "The N-terminal CUB-epidermal growth factor module pair of human complement protease C1r binds Ca²⁺ with high affinity and mediates Ca²⁺-dependent interaction with C1s." Journal of Biological Chemistry **274**(14): 9149-9159.

Toledano, P., R. Orueta, I. Rodríguez-Pintó, J. Valls-Solé, R. Cervera and G. Espinosa (2017). "Peripheral nervous system involvement in systemic lupus erythematosus: prevalence, clinical and immunological characteristics, treatment and outcome of a large cohort from a single centre." Autoimmunity reviews **16**(7): 750-755.

Toong, C., S. Adelstein and T. G. Phan (2011). "Clearing the complexity: immune complexes and their treatment in lupus nephritis." International journal of nephrology and renovascular disease **4**: 17.

Touma, Z., D. D. Gladman, D. Ibañez and M. B. Urowitz (2011). "Development and initial validation of the systemic lupus erythematosus disease activity index 2000 responder index 50." The Journal of rheumatology **38**(2): 275-284.

Troldborg, A., S. Thiel, M. J. Laska, B. Deleuran, J. C. Jensenius and K. Stengaard-Pedersen (2015). "Levels in plasma of the serine proteases and associated proteins of the lectin pathway are altered in patients with systemic lupus erythematosus." The Journal of rheumatology **42**(6): 948-951.

Truedsson, L., A. A. Bengtsson and G. Sturfelt (2007). "Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus." Autoimmunity **40**(8): 560-566.

Van Loo, P., T. Tousseyn, V. Vanhentenrijk, D. Dierickx, A. Malecka, I. V. Bempt, G. Verhoef, J. Delabie, P. Marynen and P. Matthys (2010). "T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma shows transcriptional features suggestive of a tolerogenic host immune response." Haematologica **95**(3): 440-448.

van Lookeren Campagne, M., C. Wiesmann and E. J. Brown (2007). "Macrophage complement receptors and pathogen clearance." Cellular microbiology **9**(9): 2095-2102.

Vignesh, P., A. Rawat and S. Singh (2017). "An update on the use of immunomodulators in primary immunodeficiencies." Clinical reviews in allergy & immunology **52**(2): 287-303.

Vogt, L., N. Schmitz, M. O. Kurrer, M. Bauer, H. I. Hinton, S. Behnke, D. Gatto, P. Sebbel, R. R. Beerli and I. Sonderegger (2006). "VSIG4, a B7 family-related protein, is a negative regulator of T cell activation." The Journal of clinical investigation **116**(10): 2817-2826.

Vozmediano, C., F. Rivera, J. M. López-Gómez and D. Hernández (2012). "Risk factors for renal failure in patients with lupus nephritis: data from the spanish registry of glomerulonephritis." Nephron extra **2**(1): 269-277.

Weiss, G., H. O. Madsen and P. Garred (2007). "A Novel Mannose-binding Lectin-associated Serine Protease 1/3 Gene Variant." Scandinavian journal of immunology **65**(5): 430-434.

Wiesmann, C., K. J. Katschke, J. Yin, K. Y. Helmy, M. Steffek, W. J. Fairbrother, S. A. McCallum, L. Embuscado, L. DeForge and P. E. Hass (2006). "Structure of C3b in complex with CR1g gives insights into regulation of complement activation." Nature **444**(7116): 217.

Wong, W. W., J. G. Wilson and D. T. Fearon (1983). "Genetic regulation of a structural polymorphism of human C3b receptor." The Journal of clinical investigation **72**(2): 685-693.

Xu, S., Z. Sun, L. Li, J. Liu, J. He, D. Song, G. Shan, H. Liu and X. Wu (2010). "Induction of T cells suppression by dendritic cells transfected with VSIG4 recombinant adenovirus." Immunology letters **128**(1): 46-50.

Yaniv Sherer, M. D., M. D. Alexander Gorstein, J. Marvin and Y. Shoenfeld (2004). "Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients." Semin Arthritis Rheum **34**: 501-537.

Yap, D. Y. H., S. Yung and T. M. Chan (2018). "Lupus nephritis: An update on treatments and pathogenesis." Nephrology **23**: 80-83.

Yongqing, T., N. Drentin, R. C. Duncan, L. C. Wijeyewickrema and R. N. Pike (2012). "Mannose-binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: two genes, five proteins and many functions?" Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics **1824**(1): 253-262.

Yu, C., M. E. Gershwin and C. Chang (2014). "Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: a critical review." Journal of autoimmunity **48**: 10-13.

Zhao, M., Y. Zhou, B. Zhu, M. Wan, T. Jiang, Q. Tan, Y. Liu, J. Jiang, S. Luo and Y. Tan (2016). "IFI44L promoter methylation as a blood biomarker for systemic lupus erythematosus." Annals of the rheumatic diseases **75**(11): 1998-2006.

Zollars, E. S., M. Hyer, B. Wolf and R. Chapin (2018). "Measuring lupus arthritis activity using contrasted high-field MRI. Associations with clinical measures of disease activity and novel patterns of disease." Lupus science & medicine **5**(1): e000264.

APÊNDICE

Apêndice 1 - CÁLCULOS DA REAÇÃO DE PCR-SSP PARA AMPLIFICAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE *VSIG4*

Reagente	[Inicial]	[Final]	Volume (μ L)
Tampão coral (x)	10	1	1,5
Glicerol	10%	2,0%	3
MgCl ₂ (mM)	25	0,1	0,06
dNTP (mM)	25	0,2	0,12
Iniciador HGhr	10	0,15	0,225
Iniciador HGhf	10	0,15	0,225
Iniciador <i>VSIG4</i> Prom_- 1431Tf/Af (μ M)	10	0,2	0,3
Iniciador <i>VSIG4</i> Prom_-685Cr/Gr (μ M)	10	0,2	0,3
Taq Invitrogen Platinum (U/ μ l)	5	0,04	0,12
DNA			1
H ₂ O			8,15
Total			15

Produtos esperados:

<i>VSIG4</i> Prom_-1431, -685	792 pb
HGH (controle endógeno)	431 pb

NOTA: [Inicial] = concentração inicial; [Final] = concentração final; f = direto; r = reverso; *HGH* = Hormônio do crescimento humano; *HGHf* = 5' TGCCCTCCCAACCATTCCTTA 3'; *HGhr* = 5' CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC 3'

Apêndice 2 - CÁLCULOS DA REAÇÃO DE PCR-SSP PARA AMPLIFICAÇÃO DO INTRON 1 - EXON 2 DO GENE *VSIG4*

(a) Genotipagem para os alelos A (+6069), C e T (+6432)

Reagentes	[Inicial]	[Final]	Volume (μ L)
Tampão coral (x)	10	1	1,5
Glicerol (%)	10%	2,5%	3,75
MgCl ₂ (mM)	0	0	0
dNTP (mM)	25	0,2	0,12
Iniciador <i>VSIG4</i> In1_+6069 Af/Gf	10	0,7	1,05
Iniciador Ex2_+6432 Cr/Tr	10	0,7	1,05
Iniciador GH1_f	10	0,06	0,09
Iniciador GH1_r	10	0,06	0,09
Taq Invitrogen (U/ μ L)	5	0,05	0,15
DNA			1
H ₂ O			6,2
Total			15

(b) Genotipagem para os alelos G (+6069) e T (+6432)

Reagentes	[Inicial]	[Final]	Volume (μ L)
Tampão coral (x)	10	1	1,5
Glicerol (%)	10%	0,0%	0
MgCl ₂ (mM)	0	0	0
dNTP (mM)	25	0,2	0,12
Iniciador <i>VSIG4</i> In1_+6069Gf	10	0,2	0,3
Iniciador <i>VSIG4</i> Ex2_+6432Tr	10	0,2	0,3
Iniciador GH1_f	10	0,04	0,06
Iniciador GH1_r	10	0,04	0,06
Solução Q	5	0,25	0,75
Taq Invitrogen Platinum (U/ μ L)	5	0,03	0,09
DNA			1
H ₂ O			10,82
Total			15

Produtos esperados:

GH1 (controle endógeno)	690 pb
<i>VSIG4</i> In1, Ex2_+6069,+6432	412 pb

NOTA: [Inicial] = concentração inicial; [Final] = concentração final; f = direto; r = reverso; *GH1* = Hormônio do crescimento humano; *GH1f* = 5' GTGGTCAGAGCCCCGGGCAGCACA 3'; *GH1r* = 5' GTCACAGGGATGCCACCCGGGCAGC 3'.

Apêndice 3 - CÁLCULOS DA REAÇÃO DE PCR-SSP PARA AMPLIFICAÇÃO DO INTRON 3 DO GENE *VSIG4*

(a) Genotipagem para o alelo T (+10234)

Reagentes	[Inicial]	[Final]	Volume (μ L)
Tampão coral (x)	10	1	1,5
Glicerol (%)	10%	2,35%	3,525
MgCl ₂ (mM)	25	0,4	0,24
dNTP (mM)	25	0,2	0,12
Iniciador <i>VSIG4</i> In3_+10234 Tf (μ M)	10	1	1,5
Inicador <i>VSIG4</i> In3_+10899 Ar (μ M)	10	1	1,5
Iniciador Promf (MBL)	10	0,125	0,19
Iniciador rev+270 (MBL)	10	0,125	0,19
Taq Invitrogen (U/ μ L)	5	0,05	0,15
DNA			1
H ₂ O			5,09
Total			15

(b) Genotipagem para o alelo C (+10234)

Reagentes	[Inicial]	[Final]	Volume (μ L)
Tampão coral (x)	10	1	1,50
Glicerol (%)	10%	2,35%	3,53
MgCl ₂ (mM)	25	0,4	0,24
dNTP (mM)	25	0,2	0,12
Iniciador <i>VSIG4</i> In3_+10234 Cf (μ M)	10	0,5	0,75
Iniciador <i>VSIG4</i> In3_+10899 Gr (μ M)	10	0,5	0,75
Iniciador Promf (MBL)	10	0,125	0,19
Iniciador rev+270 (MBL)	10	0,125	0,00
Taq Invitrogen (U/ μ L)	5	0,05	0,15
DNA			1,00
H ₂ O			6,78
Total			15

Produtos esperados:

Prom f -> rev+270 (MBL) (controle endógeno)	1059 pb
VSI/G4 In3_+10234, +10899	768 pb

NOTA: [Inicial] = concentração inicial; [Final] = concentração final; f = direto; r = reverso; MBL = Lectina ligante de Manose; Promf (MBL) = 5' GGCCAACGTAGTAAGAAATTTCCAGAGA 3'; rev+270 (MBL) = 5' GAGGGAGTGATGGAAACAGGGACA 3'

ANEXO

Anexo 1 - INDICE SLEDAI: Sintomas devem estar presentes na consulta ou até 10 dias antes da mesma

Descritor	Definição	Peso	SLEDAI
1. Convulsão	De início recente. Excluir causas metabólicas, infecciosas ou drogas	8	
2. Psicose	Distúrbio de percepção da realidade com prejuízo da atividade normal, inclui: alucinações, incoerência, perda da capacidade de fazer associações, desorganização do pensamento, pensamentos sem lógica, comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico. Excluir uremia ou causados por drogas	8	
3. Doença cerebral	Alteração de funções mentais, memória ou outras funções intelectuais de início rápido e com aspectos cíclicos flutuantes. Inclui flutuações no estado de consciência, incapacidade de manter foco ou manter a atenção e, pelo menos, mais dois dos seguintes itens: distúrbios de percepção, falta incoerente, insônia ou sonolência durante o dia, aumento ou diminuição da atividade psicomotora. Excluir causas metabólicas, infecciosas e por drogas	8	
4. Alteração visual	Alterações retinianas do LES. Inclui corpúsculos citoides, hemorragia retiniana, exudatos serosos ou hemorrágico na coróide, neurite ótica. Excluir alterações causadas por infecção, drogas e hipertensão	8	
5. Nervos cranianos	Neuropatia sensorial ou motora de nervos cranianos de início recente	8	
6. Cefaléia pelo LES	Cefaléia severa e persistente. Pode ter características de enxaqueca. Não deve responder a analgésicos e narcóticos.	8	
7. AVC	Acidente cerebrovascular de início recente. Excluir arterosclerose	8	
8. Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos dolorosos nos dedos, infarto periungueal, hemorragias em estilhaço, ou vasculite provocada por biópsia ou angiografia	8	
9. Artrite	Mais do que 2 articulações com sinais inflamatórios	4	
10. Miosite	Fraqueza ou dor em musculatura proximal associada a aumento de CK e/ou aldolase ou eletromiografia sugestiva de miosite	4	
11. Cilindros	Hemáticos ou granulares	4	
12. Hematúria	(>5 eritrócitos/campo). Excluir cálculo, infecção ou outra coisa	4	
13. Proteinúria	(>0,5g/24h) De aparecimento recente ou aumento de mais do que 0,5g/24h	4	
14. Piúria	>5 leucócitos/campo). Excluir infecção	4	
15. Rash	De início recente ou recorrência	2	
16. Alopecia	De início recente ou recorrente. Pode ser difusa ou em placas	2	
17. Lesão de mucosa	De início recente ou recorrência de lesão em mucosa oral ou nasal	2	
18. Pleurite	Dor pleurítica com atrito ou derrame pleural ou espessamento pleural	2	
19. Pericardite	Dor sugestiva mais um dos seguintes itens: atrito, derrame, alterações eletrocardiográficas, alterações ecocardiográficas	2	
20. Complemento	Diminuição de C3, C4, CH50	2	

21.Aumento de	>25% de ligação pelo teste de Farr ou acima do valor normal preconizado pelo laboratório	2	
22.Febre	>38°C. Excluir infecções	1	
23.Trombocitopenia	<100.000/mm ³	1	
24.Leucopenia	<3.000/mm ³ , excluir as causadas por drogas	1	
TOTAL			

Anexo 2 –SLICC/ACR-DI

Órgão /Sistema	Score	Item	Score	Pont.
Olho	2	Catarata	1	
		Alteração de retina OU atrofia óptica	1	
Neuropsiquiátrico	6	Prejuízo cognitivo OU psicose maior	1	
		Convulsões em tto > 6meses	1	
		AVC (qualquer época) (pontua 2 se teve mais de 1) OU ressecção sem ser tumor	1 (2)	
		Neuropatia craniana OU periférica (excluir ótica)	1	
Rim	3	Mielite transversa	1	
		Clearance > 50ml	1	
		Proteinúria > 3.5 em 24h	1	
Pulmão	5	Hemodiálise ou transplante	Até 3	
		Hipertensão pulmonar 9 a 2 hiperfonética ou HVD	1	
		Fibrose pulmonar (clínica ou RX)	1	
		Síndrome do pulmão encolhido (RX)	1	
		Fibrose pleural	1	
Cardiovascular	6	Infarto pulmonar OU ressecção sem ser tumor	1	
		Angina ou by-pass coronariano	1	
		IAM (pontua 2 se teve mais que 1)	1 (2)	
		Cardiomiopatia (disfunção ventricular)	1	
		Doença valvular (sopro>3/6)	1	
Vascular periférico	5	Pericardite OU pericardiectomia	1	
		Claudicação	1	
		Perda de tecido menor (ex polpa)	1	
		Perda de tecido maior (pelo menos ressecção de 1 dígito) se mais que 1 marcar 2	1 (2)	
Gastrintestinal	6	Trombose venosa com edema e ulceração OU estase venosa	1	
		Infarto ou ressecção intestinal (abaixo do duodeno) ou fígado, baço ou vesícula. Marque 2 se mais de 1 lugar	1 (2)	
		Insuficiência mesentérica	1	
		Peritonite crônica	1	
		Estenose ou cirurgia do aparelho GI	1	
M-Esquelético	6	Insuficiência pancreática requerendo reposição enzimático OU com pseudocisto	1	
		Atrofia muscular ou fraqueza	1	
		Artrite deformante ou erosiva (incluir deformidades reduzíveis)	1	
		Osteoporose com fratura ou colapso vertebral	1	
		Necrose avascular (marque se mais de um lugar)	1	
Pele	3	Osteomielite	1	
		Alopécia cicatricial	1	
		Cicatrização extensa de panículo, couro cabeludo e polpa	1	
Gônadas	1	Ulceração de pele (excluir trombose) mais que 6 meses	1	
		Meno (Andro) pausa precoce	1	
Endócrino	1	Diabetes necessitando tratamento (qualquer tto)	1	
Neoplasias	2	Malignidade (menos displasia) marque 2 se mais de 1 lugar	1 (2)	

Anexo 3 – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL EVANGÉLICO DO PARANÁ

*Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade
Evangélica Beneficente de Curitiba*

Rua Padre Anchieta, 2770
80730-000 Curitiba - PR
Fone: 41 3240-5570
Fax: 41 3240-5584

Curitiba, 19 de agosto de 2011.

Thelma Larocca Skare

Prezada Colega,

Comunicamos a V.S.a. que, em reunião ordinária do dia 16 de agosto de 2011, foi aprovado o projeto de pesquisa intitulado "Estudo da via alternativa e de doenças autoimunes associadas em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico". Protocolado neste Comitê sob o número 583/11 em 22 de junho de 2011.

Prevê a legislação que toda a documentação do projeto poderá, a qualquer momento, ser solicitada para inspeção por parte dos órgãos federais; desta forma, manterá o Comitê arquivo detalhado de cada projeto, arquivando em pasta individual o projeto inicial e relatórios de acompanhamento.

Para o projeto de V.S.a. solicitamos que dê ciência aos seus colaboradores da obrigação de, a cada seis meses a partir da data do hoje, encaminhar a este comitê relatório detalhado do andamento do projeto.

Relatórios previstos para: 20/02/2012

Atenciosamente,



Carmen A. Paredes Marcondes Ribas
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da
Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba

**SOCIEDADE EVANGÉLICA
BENEFICENTE DE CURITIBA -
PR**



Continuação do Parecer: 1.681.818

rins, paredes de vasos e artérias (processo inflamatório). Ocorre também o reconhecimento inadequado de células do próprio organismo, causando ativação desnecessária de células B e T. Estudos recentes mostram que o sistema complemento (SC) exerce um papel duplo na progressão do LES, apresentando tanto uma função protetora como patogênica, devido a um balanço entre o seu papel na remoção de complexos imunes e células apoptóticas e o seu papel na inflamação.

Considerando o papel de CR1 e CRlg na modulação do sistema complemento e a associação já observada de ambas com doenças autoimunes, nossa hipótese é a de que estariam também atuando na susceptibilidade e/ou progressão do LES.

Serão utilizadas amostras de sangue venoso periférico coletadas com anticoagulante etilenodiaminotetracético (EDTA), de pacientes ambulatoriais maiores de 18 anos do Hospital Evangélico do Paraná. No momento da coleta, também será aplicado um questionário (sledai) para correlacionar os resultados laboratoriais às características clínicas apresentadas nos últimos 10 (dez) dias do paciente. Após coleta, essas amostras serão processadas no Laboratório de Imunopatologia Molecular do HC/UFPR e alguns testes serão realizados:

extração de DNA pela metodologia "salting out"; extração de RNA; pela metodologia trizolcloroformio, seguindo as instruções do fabricante- PCRSSP

múltiplex; imunoenensaio enzimático (ELISA; real time quantitativo PCR (qRT-PCR).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar as concentrações séricas e polimorfismo dos genes VSig4 e CR1 em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e verificar associações com aspectos clínicos da doença.

Objetivo Secundário:

- Determinar as concentrações séricas de CRlg e CR1 em pacientes com LES e controles;- Determinar as concentrações de RNA mensageiro de VSig4 e CR1 em plasma de pacientes com LES e controles;- Genotipar SNPs dos genes VSig4 e CR1 em indivíduos saudáveis e com LES;-

Verificar a associação entre as concentrações séricas e os polimorfismos dos genes CRlg e CR1; -

Investigar se a concentração sérica de RNA mensageiro, e os polimorfismos dos genes CRlg e CR1 estão associadas com a susceptibilidade diferencial à doença ou com a manifestação das diferentes formas clínicas.

Endereço: Rua Padre Anchieta, 2770

Bairro: Bigorrão

CEP: 80.730-000

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41) 3240-5570

Fax: (41) 3240-5584

E-mail: comite.etica@fepar.edu.br

**SOCIEDADE EVANGÉLICA
BENEFICENTE DE CURITIBA -
PR**



Continuação do Parecer: 1.681.818

Outros	questionariosledai.pdf	15/08/2016 19:51:54	vanessa ferreira picoeli	Aceito
Declaração de Pesquisadores	autorizacaoiana.pdf	12/08/2016 15:03:59	vanessa ferreira picoeli	Aceito
Outros	ARTIGOS.pdf	12/08/2016 15:03:03	vanessa ferreira picoeli	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	12/08/2016 15:02:28	vanessa ferreira picoeli	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	12/08/2016 15:02:14	vanessa ferreira picoeli	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	12/08/2016 15:01:57	vanessa ferreira picoeli	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	12/08/2016 15:01:45	vanessa ferreira picoeli	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Reumatologia.pdf	10/08/2016 12:22:31	Renato Mitsunori Nishihara	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 23 de Agosto de 2016

Assinado por:

**JURANDIR MARCONDES RIBAS FILHO
(Coordenador)**

Endereço: Rua Padre Anchieta, 2770

Bairro: Bigorrão

CEP: 80.730-000

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3240-5570

Fax: (41)3240-5584

E-mail: comite.eticoa@feapar.edu.br

Anexo 4 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro (a) Senhor (a):

Este estudo tem como objetivo avaliar presença de POLIMORFISMOS DOS GENES *VSIG4* E *MASP1* EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.

A sua participação nessa pesquisa é voluntária. Os riscos se limitam aos inerentes a coleta de sangue venoso, como sangramento local ou ruptura venosa, sendo estes minimizados por manejo profissional e cautela. O sangue coletado será submetido a testes imunológicos e genéticos com a finalidade de detectar presença de SNPs específicos nos genes estudados dos pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico. Além disso, sua participação é importante para o aumento do conhecimento a respeito do Lúpus Eritematoso Sistêmico no mundo, podendo beneficiar outras pessoas. Com relação ao procedimento em questão, não existe outra forma de obter os dados necessários. Além da coleta de sangue, será realizada uma entrevista, buscando a presença de sintomas que possam ocorrer tanto no Lúpus Eritematoso Sistêmico quanto em outras doenças autoimunes.

Informamos que o Senhor (a) tem a garantia de acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas. Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com a Faculdade Evangélica do Paraná (FEPAR), situada na rua Padre Anchieta, Bairro Bigorriho, telefone 41 3240-5553, ambulatório de reumatologia e comunique-se como a pesquisadora Vanessa Ferreira Picceli, ou a professora e médica responsável pelo setor, Prof. Dra. Thelma Skare (41 32404843). Também é garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo.

Garantimos que as informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outras pessoas, não sendo divulgada a identificação de nenhum dos participantes. O Senhor (a) tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas e, caso seja solicitado, daremos todas as informações que solicitar. Não existirão despesas ou compensações pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Nós nos comprometemos a utilizar os dados coletados somente para pesquisa e os resultados serão veiculados através de artigos científicos em revisões especializadas e/ou em encontros

científicos e congressos, sem nunca tornar possível a sua identificação. A sua participação na pesquisa não terá qualquer prejuízo junto ao serviço de saúde.

Caso não tenha restado qualquer dúvida, o consentimento livre e esclarecido pode ser assinado. Assim, acredito ter sido suficientemente informado (a) a respeito do estudo: *POLIMORFISMOS DOS GENES VSIG4 E MASP1 EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO*. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso aos resultados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo. Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Após ter sido feita a leitura, declaro que concordo com todos os termos estabelecidos.

Data: ____/____/____

Assinatura do Informante ou Responsável

Anexo 5 – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA - MÉTODO SALTING-OUT

1º DIA: EXTRAÇÃO DE DNA

1. Transferir 240µL de Buffy-coat ou 500µL de sangue Total para um dos eppendorfs identificados somente com o código da amostra.

OBS: AMOSTRAS COAGULADAS DEVEM SER COLOCADAS EM BANHO MARIA À 37°C POR 10 MINUTOS E EM SEGUIDA COLOCÁ-LAS NO FREEZER POR MAIS 10 MINUTOS (SHOCK TÉRMICO).

Lise de Hemácias/clélulas - 1ª LAVAGEM:

2. Acrescentar 1mL de RCLB (1X) gelado.
3. Homogeinizar cada amostra no vortex manual e colocá-las no vortex automático por 20 minutos.

Programação do vortex automático:

- VORTEMP 56: Temperatura: off / RPM (x10): 140 / Tempo: 20 min.
 - THERMO SHAKER: Temperatura: off / Speed: 1400 / Tempo: 20 min.
4. Centrifugar a 13.000 rpm por 3 minutos a 20°C.
 5. Desprezar o sobrenadante.
 6. Quebrar o pelett com uma ponteira.

2ª LAVAGEM:

7. Acrescentar 1mL de RCLB (1X) gelado.
8. Homogeinizar cada amostra no vortex manual e colocá-las no vortex automático por 10 minutos.
9. Centrifugar a 13.000 rpm por 3 minutos a 20°C.
10. Desprezar o sobrenadante.
11. Quebrar o pelett com uma ponteira.

3ª LAVAGEM:

12. Acrescentar 1mL de RCLB (1X) gelado.
13. Homogeinizar cada amostra no vortex manual e colocá-las no vortex automático por 5 minutos à 55°C ou colocar em banho – maria à 55°C por 5 minutos.

Programação do vortex automático:

- VORTEMP 56: Temperatura: 55°C / RPM (x10): OFF / Tempo: 5 min.
 - THERMO SHAKER: Temperatura: 55°C / Speed: OFF / Tempo: 5 min.
14. Ainda no vortex automatic Programá-lo da seguinte forma:

Programação do vortex automático:

- VORTEMP 56: Temperatura: off / RPM (x10): 140 / Tempo: 10 min.
 - THERMO SHAKER: Temperatura: off / Speed: 1400 / Tempo: 10 min.
15. Centrifugar a 13.000 rpm por 3 minutos a 20°C.
 16. Desprezar o sobrenadante.
 17. Quebrar o pelett com uma ponteira.

4ª LAVAGEM:

18. Acrescentar 1mL de RCLB (1X) gelado.
19. Homogeneizar cada amostra no vortex manual e colocá-las no vortex automático por 10 minutos.
20. Centrifugar a 13.000 rpm por 3 minutos a 20°C.
21. Desprezar o sobrenadante.
22. NÃO Quebrar o pelett.

Desproteinização:

23. Adicionar ao pellet : 40µL de proteinase K, 20 µL de SDS 20% em temperatura ambiente e 240 µL de água de injeção.
24. Homogeneizar cada amostra no vortex manual e colocá-las no vortex automático por 40 minutos à 55°C ou Incubar em banho-maria à 55°C por 40 minutos (na ½ do tempo homogeneizar as amostras no vortex manual)

Programação do vortex automático:

- VORTEMP 56: Temperatura: 55°C / RPM (x10): 140 / Tempo: 40 min.
 - THERMO SHAKER: Temperatura: 55°C / Speed: 1400 / Tempo:40 min.
25. Deixar atingir temperatura ambiente antes de prosseguir.
 26. Adicionar 100 µL de NaCl Saturado (6M) à temperatura ambiente.
 27. Homogeneizar no vortex manual.
 28. Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos a 20°C.
 29. Transferir o SOBRENADANTE para um novo eppendorf de 1,5mL contendo 100 µL de NaCl Saturado (6M).
 30. Homogeneizar no vórtex manual.
 31. Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos a 20°C.
 32. Transferir o SOBRENADANTE para um novo eppendorf de 1,5mL.

Desidratação:

33. Acrescentar 800 µL de ETHO (Álcool) Absoluto para extração gelado.
34. Inverter gentilmente os tubos, várias vezes, para precipitar o DNA.
35. Centrifugar a 13.000 rpm por 2 minutos a 20°C.
36. Desprezar o sobrenadante.
37. Adicionar 1mL de Álcool 70% para extração gelado.
38. Centrifugar a 13.000 rpm por 2 minutos a 20°C.
39. Desprezar o sobrenadante.
40. Deixar secar em temperatura ambiente por 24 hr

2º DIA: HIDRATAÇÃO

1. Ressuspender o DNA com 50 µL de água de injeção.
2. Deixar na geladeira por 24 hr para hidratar o DNA

3º DIA: HOMOGEINIZAR

1. Colocar em banho-maria à 37°C por 30 minutos para dissolver bem.
2. Homogeneizar no vortex.

3. Verificar a concentração, diluir se necessário e armazenar à -20°C (Freezer)

