



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**POLIMORFISMOS E EXPRESSÃO DE GENES
CODIFICANTES DAS PROTEÍNAS DO INFLAMASSOMA
EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

HEIDI LACERDA ALVES DA CRUZ

**RECIFE
2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**POLIMORFISMOS E EXPRESSÃO DE GENES CODIFICANTES DAS
PROTEÍNAS DO INFLAMASSOMA EM PACIENTES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO**

HEIDI LACERDA ALVES DA CRUZ

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia
da RENORBIO como requisito
para obtenção do grau de Doutor
em Biotecnologia.

Orientador: Profº Drº Sergio Crovella

Co-orientadora: Profª Drª Paula Sandrin-Garcia

Co-orientadora: Drª Jaqueline de Azêvedo Silva

**RECIFE
2015**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Cruz, Heidi Lacerda Alves

Polimorfismos e expressão de genes codificantes das proteínas do inflamassoma em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico/ Heidi Lacerda Alves Cruz– Recife: O Autor, 2015.

93 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Sérgio Crovella

Coorientadoras: Paula Sandrin-Garcia e Jaqueline de Azêvedo Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia, 2015.

Inclui bibliografia e anexo

- 1. Lúpus eritematoso sistêmico 2. Polimorfismo (Genética) 3. Crovella, Sérgio (orientador) I. Sandrin-Garcia, Paula (orientadora) II. Silva, Jaqueline de Azevedo (coorientadora) III. Título**

616.772

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-161

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Parecer da comissão examinadora da tese de:

Heidi Lacerda Alves da Cruz

**intitulada: Polimorfismos e Expressão de Genes Codificantes das Proteínas do
Inflamassoma em Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico**

**A comissão examinadora considera o presente trabalho APROVADO em 06
de março de 2015.**

1º Examinador: _____
Profª Drª Nadja Maria Jorge Asano
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

2º Examinador: _____
Profº Drº Rafael Lima Guimarães Universidade
Federal de Pernambuco - UFPE

3º Examinador: _____
Profº Drº Lucas André Cavalcanti Brandão
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

4º Examinador: _____
Profº Drº Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Orientador: _____
Profº Drº Sergio Crovella
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Co-orientadora: _____
Profª Drª Paula Sandrin Garcia Universidade
Federal de Pernambuco – UFPE

Co-orientadora: _____
Drª Jaqueline de Azêvedo Silva
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA

Coordenadora: _____
Profª Drª Teresinha Gonçalves da Silva
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Aos pacientes, que a esperança que brota dos seus olhares se renove a cada dia.

Com carinho, dedico.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida, pelo muito que tem feito por mim e por ter me permitido chegar a mais uma conquista.

Aos meus pais, Waldete Alves e Caetano Lacerda, e a minha irmã Hegle Lacerda pelo amor incondicional e apoio dado. A certeza de termos uns aos outros me fortalece. Amo vocês!

Ao meu querido Rodrigo Seraphim, mais que um namorado, um verdadeiro companheiro e cúmplice que encontrei na vida. Obrigada pela paciência, pelo seu amor e por escolher estar sempre comigo não importa o caminho. Te amo!

Ao meu orientador Prof^o Dr^o Sergio Crovella por conceder e confiar mais uma oportunidade de trabalharmos juntos.

A minha co-orientadora Prof^a Dr^a Paula Sandrin por acreditar em mim e permitir meu crescimento pessoal-científico.

A minha co-orientadora Dr^a Jaqueline Silva, por estar sempre presente, me auxiliando e incentivando com dedicação e carinho.

A Prof^a Dr^a Alessandra Pontillo pela ajuda absoluta em todos os momentos e pelos conhecimentos repassados sempre que solicitados.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Molecular e Medicina Genômica, em especial a Catarina Addobbati e Anselmo Jiro, pela ajuda irrestrita em todos os momentos.

Aos meus irmãos-científicos que compõem o Laboratório de Imunoepidemiologia, minha família de coração: Andrea Lima, Bruna Lima, Fabiana Fulco, Gabriela Guedes, Juliana Figueirêdo, Karla Luna, Laís Lira, Lilian Montenegro, Márcia Schneider, Neide Xavier, Rosana Montenegro. Obrigada por tornarem meus dias mais lindos, sem vocês esse sonho não brilharia tanto!

Aos amigos do Laboratório Central do Centro de Ciências Biológicas, em especial aos que compõem o Laboratório de Genômica e Expressão Gênica, André Luiz, Karin Fontes e Bruno Sampaio, pela ajuda e total apoio recebidos, principalmente na reta final do Doutorado. Só tenho a agradecer!

Aos amigos Eduardo Gomes (Dudu), Anderson Barreto, Bárbara Simas, Ronaldo Henrique, Bárbara Neves, Teresa Vital, Diego Sotero, Francisco Granja, Josyélli Cabral, Thiago Gomes e Marcelo Galvão pelos momentos de descontração e de muitas gargalhadas.

Aos amigos de muito longe, mas de toda hora, Simone Migno, Yara de Leo, Saïd Allibou, Mustapha Sguenfle e Youssouf Keita, obrigada pelo carinho!

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da RENORBIO, pelo aprendizado proporcionado e as experiências repassadas.

Ao LIKA/UFPE, em especial ao Prof. Dr. José Luiz, e ao CPqAM/FIOCRUZ, em especial a Prof^a Dr^a Haiana Schindler, pela infraestrutura cedida.

A todos que de uma maneira ou de outra contribuíram para essa conquista!

Muito obrigada!

“Quando as pessoas escolhem uma existência nobre e justa, o Universo responde favoravelmente.” Abul Qassim Al-Chabbi

Resumo

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma das doenças autoimunes reumatológicas mais prevalentes na população e acomete principalmente mulheres em idade reprodutiva. Diversos órgãos e sistemas são alvos da doença, e altos graus de morbidade e até mesmo o desfecho fatal de alguns destes pacientes são possíveis consequências. Descobertas recentes fornecem evidências acerca do papel crítico do complexo molecular citoplasmático, conhecido como inflamassoma, na predisposição a doenças autoimunes. Polimorfismos de base única (SNP) em genes envolvidos com o inflamassoma têm sido associados a diversas doenças inflamatórias, mas suas relações com o LES ainda permanecem desconhecidas. O presente trabalho buscou investigar o papel da presença de polimorfismos em genes responsáveis pela resposta inflamatória e a sua relação com a predisposição ao desenvolvimento e gravidade do LES. Foram analisados 12 SNPs de 8 genes do inflamassoma (*NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL-18* e *IL1B*) em 132 pacientes lúpicos e em 154 controles saudáveis através de sonda fluorogênica Taqman. O perfil de expressão do RNAm destes genes foi avaliado através de cultura de monócitos entre os pacientes com LES e o grupo controle. Por fim, foi realizado um ensaio de ELISA para avaliar a concentração de IL-1 β entre os grupos. Nossos resultados indicaram que o alelo G e o genótipo G/G do gene *NLRP3* rs10754558 apresentou-se mais frequente entre o grupo controle em comparação com pacientes com LES (odds ratio [OR]: 0,669, $p = 0.023$ e OR: 0,369, $p = 0,011$, respectivamente). O referido SNP esteve relacionado com a nefrite lúpica, uma importante causa de morbidade e mortalidade nos pacientes com LES (alelo: OR=0,392, $p=0,001$; e genótipo: OR=0,217, $p=0,04$). O gene *IL-18* esteve associado a alterações cutâneas (OR=4,65, $p=9.49e-05$), enquanto que o gene *IL1B* esteve associado à fotossensibilidade (OR=0,50, $p=0,021$). Em relação à expressão do mRNA, foi observado que os genes *NLRP1*, *NLRC4*, *CASP1* e *IL1B* do inflamassoma apresentaram-se superexpressos nos pacientes com LES em comparação ao grupo controle. Em conclusão, nossos resultados indicam que a presença de variações genéticas no gene *NLRP3* está associada a uma menor susceptibilidade ao LES, principalmente em relação ao desenvolvimento de nefrite nestes pacientes. Além disso, diferentes componentes do inflamassoma aparecem alterados na doença, resultando em uma maior ativação e produção de IL-1 β , confirmando o papel crucial deste complexo molecular na patogênese do LES. Estes dados refletem a importância da identificação de outros fatores genéticos de risco que podem estar envolvidos na susceptibilidade a doenças inflamatórias a fim de se investigar mais profundamente a etiologia e as vias moleculares responsáveis pelas patologias autoimunes.

Palavras-chave: Lúpus eritematoso sistêmico. Inflamassoma. Nefrite lúpica. *NLRP3*. *IL-18*. *IL1B*. RNAm.

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is one of the most prevalent autoimmune rheumatic disease and affects predominantly women of child-bearing age. Many organs and systems are affected, and high levels of morbidity and even fatal outcome are possible consequences. Recent findings provide evidence about the critical role of inflammasome in the predisposition to autoimmune diseases. Genetic variants within inflammasome-related genes have been associated with various inflammatory diseases but its relation to SLE remains unknown. In this study, we aimed to investigate the role of polymorphisms in genes responsible in the inflammatory response and its relation to the development and severity of SLE. We analyzed twelve variants in 8 genes (*NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL-18*, *IL1B*) in 132 SLE patients and 154 healthy controls, using Taqman fluorogenic probes. We also evaluated the mRNA expression profile of these genes through monocytes culture in both groups, SLE patients and controls. Finally, we conducted an ELISA assay to evaluate the IL-1 β concentration in SLE patients and controls. Our results indicated a higher frequency of *NLRP3* rs10754558 G allele and G/G genotype in SLE patients in comparison to controls (odds ratio [OR]: 0.669, $p = 0.023$ e OR: 0.369, $p = 0.011$, respectively). When *NLRP3* inflammasome SNPs were analyzed as predictors of SLE clinical manifestations we observed that rs10754558 G allele and G/G genotype was correlated to nephritic lupus, an important cause of morbidity and even mortality in SLE patients (allele: OR=0.392, $p=0.001$; e genotype: OR=0.217, $p=0.04$, respectively). *IL-18* genes was associated to malar rash (OR=4.65, $p=9.49e-05$), whereas the *IL1B* gene was associated with photosensitivity (OR=0.50, $p=0.021$). In relation to mRNA expression, *NLRP1*, *NLRC4*, *CASP1* and *IL1B* inflammasome genes were upregulated in SLE patients in comparison to healthy controls. In conclusion, our results indicate that genetic variations in *NLRP3* gene may contribute to SLE protection, mainly to nephritis development in these patients and that different inflammasome components appear altered in the disease, resulting in enhanced activation and subsequently IL-1 β production, confirming that the inflammasomes play a crucial role in SLE pathogenesis. These data indicate the importance of the identification of other genetic risk factors that may be involved in susceptibility to inflammatory diseases in order to investigate further the etiology and molecular pathways responsible for autoimmune diseases

Keywords: systemic lupus erythematosus. Inflammasome. Lupus nephritis. *NLRP3*. *IL-18*. *IL1B*. mRNA.

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Visão geral da patogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico.	20
Figura 2. Manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com LES, envolvendo os diferentes órgãos e sistemas.	24
Figura 3. Manifestações clínicas do LES.	25
Figura 4. Distribuição dos <i>loci</i> e genes associados ao LES nos cromossomos humanos.	31
Figura 5. Representação da organização da família dos receptores do tipo NOD (NLRs).	34
Figura 6. Organização estrutural durante a formação do inflamassoma.	35
Figura 7. Representação esquemática dos SNPs dentro dos componentes do inflamassoma.	38

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1. Critérios para o diagnóstico do Lúpus Eritematoso Sistêmico de acordo com o ACR.	27

Lista de abreviaturas

ACR - *American College of Rheumatology* (Colégio Americano de Reumatologia)

AIM2 – *Absent in melanoma 2* (Ausente em melanoma)

2) ANA – Anticorpos anti-nucleares

APC – *Antigen-Presenting Cell* (Célula apresentadora de antígeno) APS - *Antiphospholipid* (Antifosfolipídico)

ATP – Adenosina trifosfato

BANK1 - *B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1* (Proteína de célula B com repetições de anquirina)

BLK – *B lymphoid tyrosine kinase* (Tirosina quinase linfóide B)

CARD – *Caspase activation and recruitment domains* (Domínio de recrutamento e ativação de caspase)

CD - Células dendríticas

CTLA-4 - *Cytotoxic T lymphocyte antigen-4* (Antígeno 4 de célula T citotóxica)

DAMP – *Damage-associated molecular pattern* (Padrão molecular associado a dano)

DNA - *Desoxirribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucléico)

dsDNA - *Double-stranded DNA* (DNA dupla-fita)

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (Ensaio imunoenzimático) FAN - fatores antinucleares

FPS – Fator de proteção solar

GWAS - *Genome wide association study* (Estudo de associação de genoma amplo) HLA – *Human Leukocyte Antigen* (Antígeno de leucócito humano)

IFI - imunofluorescência indireta

IFN α – Interferon alfa

IFN β – Interferon beta

IFN- γ - Interferon gamma

IL - Interleucina

IFN-I - Interferon tipo I

IRF5 – *Interferon regulatory factor 5* (Fator regulatório de interferon)

5) LES – Lúpus eritematoso sistêmico

LN - *Lupus Nephritis* (Lúpus nefrítica)

LRR – *Leucine rich region* (Região rica em leucina)

MHC - *Major Histocompatibility Complex* (Complexo de histocompatibilidade maior)

NF- κ B – *Nuclear factor kappa B* (Fator nuclear kappa B)

NLRC4 – *NLR family CARD domain-containing protein 4* (Família NLR, domínio cartão contendo 4)

NLRP1 – *NOD-like protein 1* (Proteína tipo NOD 1)

NLRP3 – *NOD-like protein 3* (Proteína tipo NOD 3)

NOD – *Nucleotide-binding oligomerization domain* (Domínio de oligomerização de nucleotídeos)

OR - Odds Ratio

PAMP – *Pathogen-associated molecular patterns* (Padrão molecular associado a patógenos) PBMC - *Peripheral blood mononuclear cell* (Sangue periférico de células mononucleares) PDCD-1 - *Programmed cell death-1* (Morte celular programada 1)

PRR – *pattern receptor recognition* (Receptores de reconhecimento padrão) PYD – *Pyrin domain* (Domínio de purina)

RNP - *Ribonucleoprotein* (Ribonucleoproteínas)

RT-PCR – *Reverse transcriptase polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa)

SC – Sistema complemento

SD - *Standard Deviation* (Desvio padrão)

SLE - *Systemic Lupus Erythematosus* (Lúpus eritematoso sistêmico)

SLEDAI - *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*

SLICC - *Systemic Lupus International Collaborating Clinics*

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de Base Única)

STAT4 – *Signal transducer and activator of transcription 4* (Sinal de tradução e ativador de transcrição 4)

TCR - *T-cell receptor* (Receptor de célula T)

TLR – *Toll-like Receptor* (Receptor de homologia Toll)

TNF – *Tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)

UTR - *Untranslated Region* (Região não-traduzida)

SUMÁRIO

Item	Página
1. Introdução.....	16
2. Revisão da Literatura.....	18
2.1. Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	18
2.2. Epidemiologia do LES.....	19
2.3. Etiologia e Patogênese do LES.....	19
2.4. Aspectos Imunológicos do LES.....	21
2.5. Manifestações Clínicas do LES.....	24
2.6. Visão Geral dos Métodos Diagnósticos e Tratamento.....	27
2.7. Fatores Genéticos envolvidos na Susceptibilidade do LES.....	29
2.8. O complexo Inflamassoma.....	33
2.8.1. Polimorfismos nos Genes Codificantes do Inflamassoma.....	36
3. Justificativa.....	39
4. Objetivos.....	40
5. Referências Bibliográficas.....	41
6. Artigo I.....	53
7. Artigo II.....	75
8. Conclusões Gerais.....	96
9. Anexo.....	97
9.1. Aprovação do Comitê de Ética.....	97

1. Introdução

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) consiste em uma doença inflamatória crônica, multissistêmica, de causa desconhecida e de natureza autoimune, caracterizada pela presença de diversos autoanticorpos (Gualtierotti et al., 2010). A doença tem uma evolução variável, podendo cursar de forma insidiosa ou fulminante, evoluindo com manifestações clínicas polimórficas, com períodos de exacerbações e remissões relacionadas a variações individuais, manejo terapêutico e outros fatores desconhecidos (Petri, 2002). De etiologia não esclarecida, o desenvolvimento da doença está ligado à predisposição genética e a fatores ambientais, como luz ultravioleta e alguns medicamentos (Kyttaris, 2010).

A doença acomete predominantemente indivíduos do sexo feminino, com uma taxa que varia de 4 a 13 mulheres para cada homem. Indivíduos de todos os grupos étnicos podem ser acometidos pelo LES, sendo mais comum em indivíduos da raça negra. Sintomas constitucionais gerais como astenia, febre e emagrecimento são comuns no LES, e as lesões dermatológicas são muito frequentes e polimorfas, envolvendo pele, vasos e mucosas (Vyse; Kotzin, 1998).

Embora a etiologia do LES não se encontre totalmente compreendida, presume-se que fatores genéticos estejam envolvidos na patogênese da doença, uma vez que ocorre a ativação de células B e T autorreativas, sugerindo que genes de susceptibilidade influenciem a quebra da tolerância em ambas as populações de linfócitos. Ainda que múltiplas anormalidades nos fenótipos e nas funções das células B e T tenham sido descritas no LES humano e em modelos murinos, ainda não está definido claramente qual é o efeito primário dos fatores genéticos na patogênese da doença (Hom et al., 2008).

A genética do LES é complexa e vários genes da imunidade adaptativa foram descritos como candidatos ao desenvolvimento da doença (*HLA-II*, *IRF5*, *STAT4*, *BLK*, *ITGAM*). No entanto, genes da resposta inflamatória e da imunidade inata parecem desempenhar igualmente um papel fundamental na patogênese e gravidade do LES (Crow, 2008; Hom et al., 2008).

Estudos indicam que uma ativação anormal dos genes relacionados à resposta inflamatória, resultando em uma ativação alterada da IL-1 β e/ou NF- κ B, podem contribuir para uma patogênese complexa das desordens autoimunes e de forte componente inflamatório, como no caso do LES (Shaw et al., 2011). A secreção de IL-1 β e IL-18 é induzida pela ativação de um complexo molecular citoplasmático, conhecido como inflamassoma, composto por 4 receptores intracelulares (NALP1/NLRP1, NALP3/NLRP3, IPAF/NLRC4 e AIM2), por moléculas adaptadoras (CARDINAL/CARD8, ASC/PYCARD) e por moléculas

efetoras como a caspase-1, responsável pela clivagem da pró-IL-1 β e pró-IL-18 em IL-1 β e IL-18, respectivamente. Cada receptor é capaz de reconhecer moléculas de estresse endógeno, amplificando a resposta imune inata e desencadeando um processo inflamatório. A presença de mutações nos genes do inflamassoma tem sido relacionada com alterações no padrão da resposta inflamatória, levando a processos patogênicos crônicos (Schroder; Tschopp, 2010).

Diante do exposto, o presente trabalho buscou avaliar a distribuição da frequência de 12 polimorfismos de base única (SNPs) em 8 genes do complexo inflamassoma (*NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL18*, *IL1B*), assim como o perfil de expressão destes genes, em pacientes com LES e indivíduos saudáveis, com o objetivo de investigar a relação entre estes SNPs e a predisposição para o desenvolvimento e gravidade da doença.

2. Revisão da Literatura

2.1. Lúpus Eritematoso Sistêmico

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) consiste em uma doença autoimune, caracterizada pela produção de múltiplos autoanticorpos, especialmente contra componentes do núcleo celular, e pelo comprometimento de vários órgãos do corpo (Drake; Kotzin, 1992). Trata-se de uma doença crônica, de intensa inflamação e heterogênea quanto ao espectro patológico, incluindo um número diverso de manifestações clínicas, cada uma com a produção de autoanticorpos particulares (Drake; Kotzin, 1992). Tal heterogeneidade patológica é reflexo dos danos causados pela deposição de diferentes imunocomplexos nos tecidos atingidos (Tsao; Grossman, 2001).

O LES apresenta uma evolução variável, podendo cursar de forma insidiosa ou fulminante, com recorrências e remissões relacionadas a variações individuais, manejo terapêutico e outros fatores desconhecidos (Gualtierotti et al., 2010).

O termo *lupus* (do latim, lobo) foi usado pela primeira vez no século 13, em doenças relacionadas à pele que ocasionavam ulcerações semelhantes a uma “mordida de lobo” (Cameron, 2001). Em 1838, o termo “lúpus eritematoso” passou a ser utilizado primeiramente por Pierre Cazenave (Cazenave; Schedel, 1838 *apud* Holubar, 2006) e sete anos depois o *rash* em borboleta, típico do LES, foi descrito por Ferninand von Hebra (von Hebra, 1845 *apud* Holubar, 2006) com o primeiro caso da doença sendo descrito em 1851. Nessa época, além de acometer a pele, percebeu-se que o LES atingia da mesma forma múltiplos órgãos internos. No início dos anos de 1900, através de estudos *post mortem*, chegou-se à conclusão de que o LES poderia afetar órgãos internos independentemente de causar desordens cutâneas. Nas décadas de 70 e 80, o amplo espectro de manifestações clínicas para o LES foi então apropriadamente estabelecido, e com o advento de testes laboratoriais na última metade do século 20, foi possível diagnosticar mais facilmente a doença através dos testes de imunofluorescência indireta para anticorpos anti-nucleares (ANA), anti-DNA de dupla fita (dsDNA), anti-ribonucleoproteínas (RNP), e anticorpos dirigidos contra antígenos extraíveis nucleares (ENA), conhecidos como anti-Smith (Sm), anti-Ro e anti-La. No entanto, apesar dos autoanticorpos mencionados acima não serem específicos e exclusivos para o LES, estes ainda dominam o diagnóstico (Holubar, 2006).

2.2. Epidemiologia do LES

Estudos epidemiológicos envolvendo pacientes com LES são de difícil realização em virtude da variabilidade de manifestações clínicas da doença, pelo fato do diagnóstico depender da caracterização de determinados sinais e sintomas pré-estabelecidos pelos critérios de classificação e pela sua baixa frequência na população (Alarcón et al., 2006).

Um estudo epidemiológico incluindo os Estados Unidos, Ásia, Europa, Martinica e Austrália revelou uma variação de incidência de 1 a 32 casos para cada 100.000 pessoas por ano. A maior prevalência foi observada nos países europeus quando comparados com os Estados Unidos. Dentre esses, Espanha, Itália e França foram os que apresentaram maior prevalência do LES (Danchenko et al., 2006). A diferença significativa entre as taxas de prevalência e incidência nas diferentes regiões do mundo deve-se principalmente a variações nos fatores genéticos, populacionais e ambientais (Vilar; Sato, 2002). Essas diferenças podem ser observadas entre diferentes grupos étnicos onde os indivíduos com ascendência Africana, Hispânica ou Asiática, que apresentam prevalência cerca de três vezes maior quando comparadas com indivíduos Caucasianos (Pons-Estel et al., 2010).

No Brasil, existem poucos estudos epidemiológicos realizados com LES, entre os quais se pode citar o de Vilar e Sato (2002), realizado na cidade de Natal no Nordeste do país, onde a taxa de incidência foi de cerca de 8,7 casos para cada 100.000 pessoas, sendo maior em mulheres, com cerca de 14 casos para cada 100.000 pessoas/ano e nos homens de 2,2 casos para cada 100.000 pessoas/ano. Além deste, o trabalho de Nakashima et al. (2011), realizado no estado do Paraná, verificou uma incidência de 4,8 casos para cada 100.000 habitantes/ano.

Em geral, o surgimento da doença ocorre entre 16-55 anos em 65% dos casos, abaixo dos 16 anos em 20% e acima dos 55 anos em 15% dos casos (Kyttaris, 2010). Nestes grupos, a taxa de mulheres e homens afetados não varia da mesma forma que em adultos, confirmando assim a influência dos fatores hormonais na doença (Kyttaris, 2010).

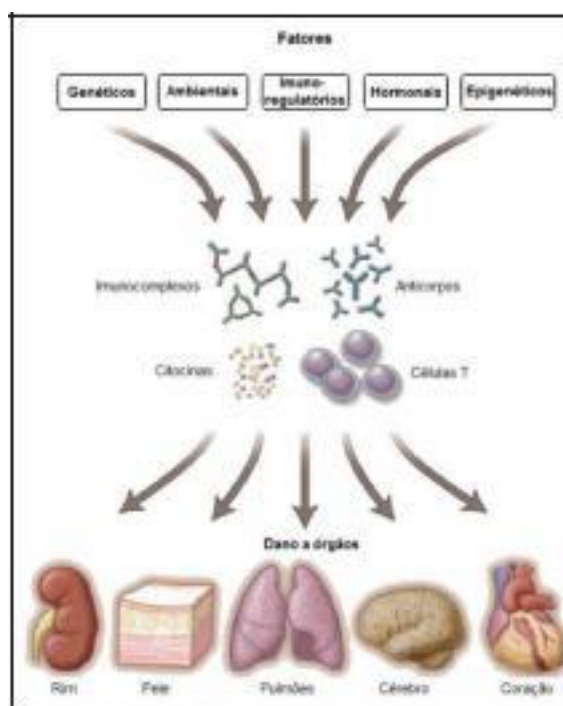
2.3. Etiologia e Patogênese do LES

As doenças autoimunes ocorrem em mais de 5% da população (Tobón et al., 2012) e são caracterizadas por um descontrole do sistema imune devido à perda da capacidade de diferenciação do "próprio" para o "não próprio", ou seja, da capacidade de autotolerância do sistema imunológico. Sendo assim, as moléculas que são produzidas normalmente pelo organismo ou aquelas que não eram imunogênicas passam a ser consideradas partículas estranhas, iniciando um processo anormal de combate a essas moléculas (Abbas; Lichtman; Pillai, 2008).

A autotolerância pode ser dividida em tolerância central e tolerância periférica. Na tolerância central, linfócitos imaturos que reconhecem antígenos próprios na medula óssea e no timo são eliminados por apoptose. No caso da tolerância periférica, linfócitos reativos maduros quando encontram antígenos próprios nos tecidos periféricos são eliminados ou desativados pelos mecanismos de anergia, apoptose ou supressão pelos linfócitos T reguladores. Quando os linfócitos autorreativos escapam desses mecanismos de tolerância e são influenciados por outros fatores, ocorre o desenvolvimento da resposta autoimune com a formação dos autoanticorpos (Abbas; Lichtman; Pillai, 2008).

O LES trata-se de um exemplo clássico de doença autoimune multiorgânica. Assim como encontrado em várias outras desordens autoimunes, a etiologia do LES apresenta caráter multifatorial, e, embora os fatores que contribuam para o desencadeamento da doença não estejam completamente esclarecidos, sabe-se que mecanismos genéticos, ambientais, hormonais e imunológicos estejam envolvidos em tal (Gualtierotti et al., 2010), como mostrado na figura 1.

Figura 1. Visão geral da patogênese do lúpus eritematoso sistêmico. Fatores genéticos, ambientais, hormonais, epigenéticos e imunorregulatórios atuam sequencial e/ou simultaneamente, resultando em dano tecidual, característico da doença.



Fonte: Adaptado de Tsokos, 2011.

É necessária uma sucessão de eventos ou a presença de um conjunto de fatores atuando ao longo do tempo para que o LES ocorra, sendo estes, principalmente: i) a predisposição genética, ii) o sexo, iii) a ação de estímulos ambientais, iv) a presença de autoanticorpos, e v) a desregulação de células B e T (Choi et al., 2012).

A participação de agentes infecciosos, algumas drogas, radiação solar e hormônios, atuando em um indivíduo geneticamente predisposto, proporciona o reconhecimento anormal de autoantígenos pelo sistema imune e a perda da tolerância imunológica associada à falha nos mecanismos supressores e de imunorregulação (Zenewicz et al., 2010). Essa alteração na resposta imune tem função significativa no desenvolvimento do LES, contribuindo com o dano aos tecidos, na via de liberação de citocinas inflamatórias, com a ativação descontrolada de células B e T, conduzindo no final a uma produção patogênica de autoanticorpos (Choi et al., 2012).

A formação e deposição de imunocomplexos, aliada à ativação do sistema complemento (SC) desencadeiam o processo inflamatório e subsequente lesão tecidual, a exemplo do observado no acometimento renal de pacientes com glomerulonefrite lúpica. Autoanticorpos dirigidos contra membranas celulares contribuem para as citopenias (anemias hemolíticas, leucopenia, linfopenia e trombocitopenia), além de outras manifestações detectadas na doença (Gualtierotti et al., 2010). A injúria celular promovida por autoanticorpos, ativação do SC e inflamação crônica predis põem ao surgimento de novos autoantígenos, que mantém a estimulação da resposta imunológica, levando a uma perpetuação da resposta autoimune (Tiffin; Adeyemo; Okpechi, 2013).

2.4. Aspectos Imunológicos do LES

Dentre as anormalidades imunológicas, os pacientes com LES podem apresentar diversas alterações, relacionadas principalmente com os linfócitos T e B. A interação de fatores ambientais e/ou hormonais, em indivíduos geneticamente susceptíveis, predispõe à hiperatividade de linfócitos B, induzindo à formação de autoanticorpos dirigidos contra proteínas citoplasmáticas, moléculas de superfície celular e constituintes nucleares, especialmente o DNA. Os linfócitos T também têm participação ativa no processo autoimune do LES e têm sido implicadas como necessárias à formação de autoanticorpos. Estudos "in vitro" relatam que a produção do anticorpo anti-DNA é dependente da participação de células T (Crispín et al., 2007).

Cada linfócito T possui um receptor (TCR, do inglês T-cell receptor) na membrana com a capacidade de interagir com um antígeno associado a uma molécula de MHC (Major

Histocompatibility Complex) presente na superfície da célula apresentadora de antígeno (APC, do inglês Antigen-Presenting Cell) (Mendes, 2010). O complexo do receptor CD3 das células T, ao reconhecer e se ligar aos antígenos, envia sinais de ativação para o interior da célula através de uma cascata de sinalização, a qual envolve diversas estruturas e moléculas. Uma característica dos pacientes com LES é a sinalização precoce e amplificada do TCR (Crispín et al., 2010; Kyttaris, 2010), induzindo a produção de autoanticorpos anti-DNA por células B autorreativas (Gualtierotti et al., 2010).

As células B imaturas, que em condições normais reconhecem e são ativadas contra autoantígenos durante seu processo de maturação, são submetidas à seleção negativa pelos mecanismos de tolerância do sistema imune, evitando a presença de linfócitos B autorreativos em órgãos do sistema imune periférico (Yurasov et al., 2006; Kyttaris, 2010). As células B funcionam como APCs na interação com células T, além de apresentar uma grande diversidade de funções regulatórias tanto na resposta imune quanto no LES. Apesar de mais comumente reconhecidas pela liberação de anticorpos, as células B atuam na produção de citocinas e a interação direta com as células T e células dendríticas, com impacto significativo na modulação da resposta imune (Abbas; Lichtman; Pillai, 2008).

Os autoanticorpos são produzidos pelas células B autorreativas, as quais fazem parte do repertório normal de células dos indivíduos, entretanto, no LES, essas células desempenham um papel alterado, provavelmente resultante de um processo de maturação defeituoso (Kyttaris, 2010). Populações de células B “naive” em pacientes com LES apresentam mais de 50% das células autorreativas antes mesmo do primeiro encontro com antígenos. Esse dado sugere falha nos pontos de checagem durante a maturação desses linfócitos, as quais resultam em um maior número de células B autorreativas que produzem autoanticorpos (Yurasov et al., 2006). Em condições normais, a produção de autoanticorpos é importante para a remoção de autoantígenos, liberados tanto por células em apoptose como em necrose. A produção de autoanticorpos causa a formação de imunocomplexos, os quais se depositam nos tecidos e ativam o sistema complemento. Esses imunocomplexos, uma vez não removidos, podem desencadear a resposta inflamatória, causando o dano tecidual (Kyttaris, 2010).

Essa teoria foi fortalecida pelo fato de que vários componentes do sistema complemento apresentam deficiência e possuem seus genes associados com a susceptibilidade ao LES. Indivíduos com deficiência de C1q, C2 ou C4 mostram um risco maior de desenvolver o LES do que pessoas saudáveis (Manderson et al., 2004). Esses achados indicam o papel fundamental do sistema complemento, não apenas como primeira linha de defesa contra patógenos, mas também no processo de desenvolvimento da autoimunidade, uma vez

que os componentes deste sistema opsonizam os imunocomplexos, facilitando a sua remoção e, conseqüentemente, prevenindo o desencadeamento de uma resposta inflamatória (Kytтары, 2010).

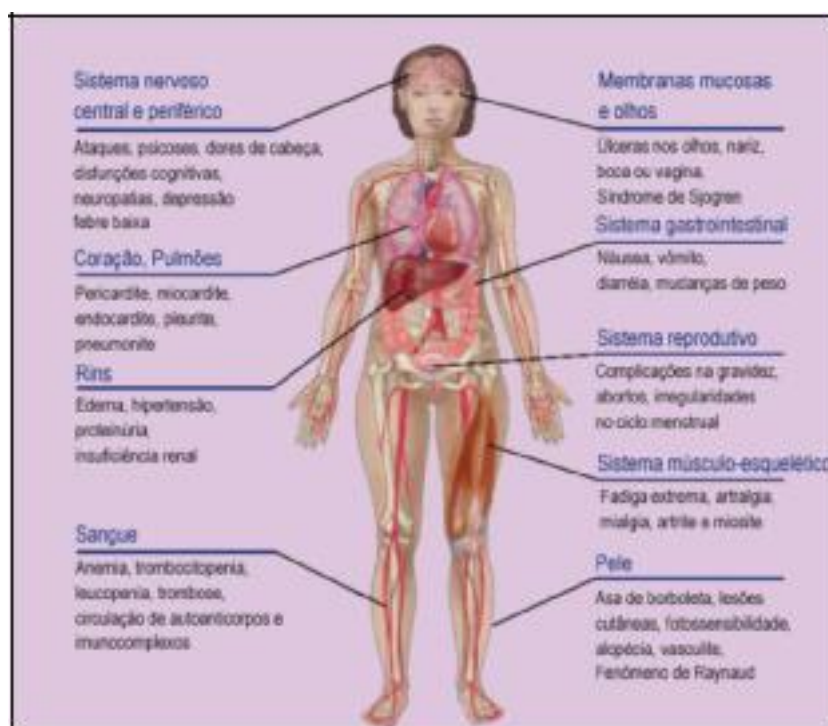
As células dendríticas (CD) são outro grupo de células do sistema imune que também apresentam papel importante no desenvolvimento do LES, embora essa relação seja complicada pelo fato de existirem vários subconjuntos dessas células. As CDs podem influenciar no desenvolvimento do LES das seguintes maneiras: na apresentação de autoantígenos, secreção de citocinas pró-inflamatórias e induzindo a produção de autoanticorpos pelas células B, seja de forma direta ou indireta (Choi et al., 2012). As CDs são derivadas de monócitos e residem primariamente em tecidos epiteliais como a pele e a mucosa dos órgãos. Essa distribuição em vários tecidos permite a imunovigilância contra potenciais patógenos invasores. As duas principais funções das CDs são induzir a resposta imune contra patógenos e manter a autotolerância, posicionando essas células na interface da resposta imune inata e adaptativa (Seitz; Matsushima, 2010).

As citocinas são proteínas secretadas pelas células da imunidade inata e adaptativa e parecem ter um papel fundamental na modulação da resposta imune. Seus efeitos tanto podem ser estimuladores, como proliferação, ativação e quimiotaxia, como supressores, favorecendo a diminuição ou bloqueio de uma resposta imune (Apostolidis et al., 2011). Várias citocinas têm sido associadas ao LES ao longo dos últimos anos. O Interferon tipo I (IFN α e IFN β) apresenta diversas funções, como antiviral, antiproliferativa e na modulação da resposta imune. Devido a esses efeitos, o IFN I foi considerado como um dos possíveis responsáveis pelo processo patogênico de diversas doenças autoimunes, incluindo o LES (Apostolidis et al., 2011). Alguns estudos analisaram os níveis séricos de IFN I em pacientes com LES e observaram uma alta produção de IFN α em famílias com pessoas afetadas pela doença, tanto nos familiares saudáveis quanto nos pacientes (Niewold et al., 2007). Esses resultados indicam que o controle genético do IFN I é importante para a susceptibilidade à doença, mas que, para o desenvolvimento das manifestações clínicas, é necessária ainda a associação com outros fatores como os genéticos, ambientais e hormonais (Apostolidis et al, 2011). Além disso, mais da metade dos pacientes com LES apresentam uma desregulação na expressão de genes da via do IFN I, levando ao que se chama de "assinatura do interferon" (Borchers et al., 2012).

2.5. Manifestações Clínicas do LES

Sendo o LES uma doença sistêmica, vários órgãos e sistemas são acometidos ao mesmo tempo. As manifestações clínicas podem atingir órgãos vitais e tecidos como a pele, sistema nervoso central, renal, sanguíneo e imunológico, como mostrado na figura 2, variando de indivíduo para indivíduo, com acometimentos simultâneos, aditivos ou sequenciais, cíclicos ou persistentes, agudos ou crônicos, com períodos de remissão e exacerbação relativos a órgãos e sistemas diferentes (Assis;Baaklini, 2009).

Figura 2. Diagramação dos principais órgãos e sistemas afetados pelo LES e suas respectivas manifestações clínicas.



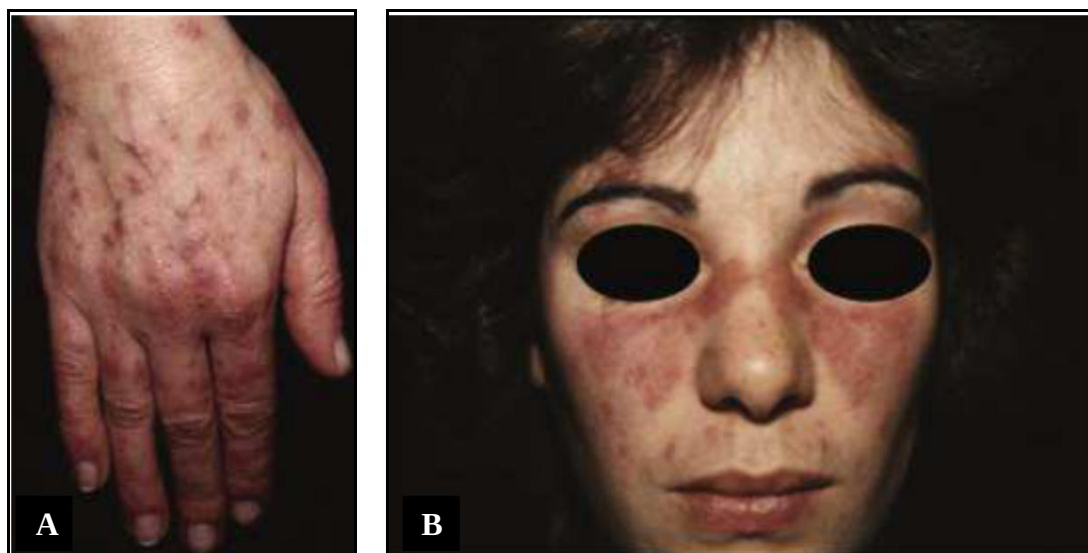
Fonte: www.misodor.com/LUPUS.html.

O padrão inicial da doença habitualmente manifesta-se com sintomas constitucionais, como mal-estar, fadiga, febre baixa, perda de peso e adenomegalia e costuma evoluir com manifestações cutâneas e articulares, alterações hematológicas e sorológicas (Assis; Baaklini, 2009). As alterações cutâneas, como a fotossensibilidade, rash malar e discoide e alopecia, atingem cerca de 85% dos pacientes. A fotossensibilidade ocasiona erupções cutâneas devido à exposição à luz ultravioleta e, diferente dos rash malar e discoide, podem acometer não somente a face, mas também os braços e mãos e persistir por mais de um dia, como mostrado na figura 3 a seguir (Uva et al., 2012).

O comprometimento articular nos pacientes com LES atinge cerca de 90% dos indivíduos, com artralgia, artrite e osteonecrose como sendo as principais manifestações. Tais manifestações geralmente são não-erosivas, assimétricas, migratórias, moderadamente dolorosas e não causam deformações (Goh et al., 2012).

Uma das manifestações clínicas mais perigosas na doença é nefrite, responsável pela maior morbidade e mortalidade no LES. A frequência de envolvimento renal no LES juvenil é alta e atinge cerca de 50-80% dos pacientes, sem diferir com etnicidade (Borchers et al., 2012). As alterações neurológicas relatadas acometem de 25% a 70% dos pacientes com LES e podem afetar qualquer parte do sistema nervoso (Cojocaru et al., 2011).

Figura 3. Manifestações clínicas do LES. Em (A), lesões cutâneas ocasionadas por exposição à luz ultravioleta (UV). Em (B), eritema malar ou lesão em “asa de borboleta”, frequente nos pacientes lúpicos.



Fonte: Uva et al., 2012.

Os pacientes com LES podem apresentar manifestações vasculares, como por exemplo, vasculites cutâneas, as quais são observadas principalmente em vasos de pequeno calibre. A vasculite nos pacientes com LES é mediada tanto pela deposição de imunocomplexos como pela ligação direta de anticorpos aos componentes celulares e, consequentemente, pela ativação do sistema complemento e inflamatório (Uva et al., 2012).

O fenômeno de Raynaud é uma das manifestações vasculares dos pacientes com LES, e se caracteriza por uma resposta vascular exagerada a baixas temperaturas e ao estresse emocional. Esse fenômeno é caracterizado pela alteração da cor nas pontas dos dedos, resultado da vasoconstrição anormal das arteríolas das digitais, sendo esse um processo reversível (Uva et al., 2012).

O comprometimento do sistema cardiovascular pode atingir cerca de 65% dos pacientes com LES, sendo rara como primeira ocorrência da manifestação da doença (Goh et al., 2012). As alterações do sistema cardiovascular podem afetar o pericárdio, o miocárdio, as válvulas cardíacas e as artérias coronárias (Lalani et al., 2004). A pericardite é uma das manifestações cardíacas do LES mais comuns, sendo inclusive um dos critérios usados para o diagnóstico da doença na classificação ACR (Colégio Americano de Reumatologia) (Gladman et al. 1996; Hochberg, 1997).

Autópsias em pacientes com LES revelam que em mais de 60% dos casos ocorre a pericardite, porém apenas 25% a manifestam clinicamente. A miocardite é uma manifestação menos comum, sendo muitas vezes clinicamente silenciosa, podendo estar associada com um processo inflamatório contra o músculo estriado, resultando em um dano ao miocárdio (Goh et al., 2012).

Manifestações neurológicas são relatadas em 25 a 70% dos pacientes com LES e podem afetar qualquer parte do sistema nervoso (Cojocarú et al., 2011). Pela classificação do ACR (Gladman et al. 1996; Hochberg, 1997), podem ocorrer comprometimentos diversos do sistema nervoso central como: estado confusional agudo, disfunção cognitiva, psicose, distúrbios do humor, distúrbios da ansiedade, cefaleia, doença cerebrovascular, mielopatia, distúrbios do movimento, síndromes desmielinizantes, convulsões e meningite asséptica; assim como distúrbios do sistema nervoso periférico tais como: neuropatia cranial, polineuropatia, plexopatia, mononeuropatia simples ou múltipla, polirradiculoneuropatia aguda inflamatória desmielinizante (síndrome de Guillain-Barré), distúrbio autonômico e miastenia gravis (Assis; Baaklini, 2009).

O envolvimento do sistema nervoso central é uma das maiores causas de mortalidade e morbidade em pacientes com LES (Goh et al., 2012), sendo as dores de cabeça e transtornos de humor as principais manifestações neurológicas relatadas (Cojocarú et al., 2011).

No curso da doença, mais da metade dos pacientes com LES desenvolvem manifestações hematológicas (Assis; Baaklini, 2009), entre elas, anormalidades dos elementos formadores do sangue, da coagulação e fatores fibrinolíticos, além de sistemas relacionados. As manifestações hematológicas mais relevantes do LES são anemia, leucopenia, trombocitopenia e a síndrome do anticorpo antifosfolipídico (APS, do inglês antiphospholipid syndrome) (Sasidharan et al., 2012).

Em relação às alterações imunológicas, uma das principais características do LES é a formação de autoanticorpos contra uma grande variedade de componentes celulares (Arbuckle et al., 2003), como antígenos nucleares, por exemplo, DNA nativo, DNA desnaturado e as proteínas histonas, U1-RNP, SSA, SSB e ribossomal (Cojocarú et al., 2011). Apesar da

presença desses autoanticorpos ser uma característica constante na doença, a sua concentração e diversidade variam entre os pacientes (Nath et al., 2004).

2.6. Visão Geral dos Métodos Diagnósticos e Tratamento

O diagnóstico do LES é complexo em virtude da heterogeneidade clínica da doença. Diante das características polimórficas observadas, convencionou-se realizar seu diagnóstico através da associação de achados clínicos e laboratoriais, conforme preconizado pelo American College of Rheumatology (ACR) em 1982, e revisados em 1997. Foram estabelecidos 11 critérios, como mostrado na tabela 1, dos quais o paciente deve apresentar pelo menos 4 para o diagnóstico oficial de LES. São eles: presença de rash cutâneo malar ou discóide, fotossensibilidade, úlceras orais, artrite, serosite, desordens renais, neurológicas, hematológicas, imunológicas e presença de anticorpos antinucleares (Tsokos, 2011).

A presença desses critérios pode diagnosticar o paciente como portador da doença com 95% de especificidade e 85% de sensibilidade (Louis; Fernandes, 2001).

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

Crítérios	Definição
Eritema Malar	Eritema fixo, plano ou elevado, sobre as eminências malares, tendendo a poupar sulco nasolabial;
Rash Discóide	Placas elevadas, eritematosas, com descamação ceratótica e crostículas;
Fotossensibilidade	Eritema cutâneo, às vezes maculopapular, como resultado de uma exposição solar;
Úlceras Orais	Ulceração oral ou nasofaríngea;
Artrite	Artrite não erosiva, envolvendo duas ou mais articulações periféricas;
Serosite	Pleurite ou pericardite;
Desordens Renais	Proteinúria e/ou desordens no sedimento urinário;
Distúrbios Neurológicos	Convulsões e psicose;
Desordens Hematológicas	Anemia, leucopenia, linfopenia e trombocitopenia;
Alterações Imunológicas	Presença dos anticorpos anti-dsDNA, anti-SM e antifosfolípídico;
Fator Anti-Nuclear	Presença de anticorpo antinuclear.

A avaliação laboratorial reforça o diagnóstico quando se observa alterações tais como: leucopenia, anemia, linfopenia, plaquetopenia e alterações do sedimento urinário. De particular importância para o diagnóstico de LES é a pesquisa de anticorpos ou fatores antinucleares (FAN) por imunofluorescência indireta (IFI), utilizando como substrato as células HEp-2, conforme proposta do I Consenso Brasileiro sobre laudos de FAN. A positividade desse teste, embora não específico para o diagnóstico de LES, serve como triagem em virtude de sua alta sensibilidade (maior que 95%) e alto valor preditivo negativo. Nos raros casos de LES com pesquisa de FAN negativa, particularmente com lesões cutâneas fotossensíveis, recomenda-se a realização da pesquisa de anticorpos anti-SSa/Ro. A pesquisa de anticorpos como anti-DNA nativo, anti-Sm, anti-RNP e células LE pode contribuir para melhor caracterização laboratorial do quadro (Sociedade Brasileira de Reumatologia, 2006).

Segundo Sato et al. (2002) algumas medidas gerais devem ser adotadas como parte importante da abordagem terapêutica, como: oferecer informações gerais sobre a doença, seu diagnóstico e seu tratamento, tanto para o paciente como para familiares; fornecer acompanhamento psicológico; estimular a prática de atividades físicas regulares, exceto nos períodos de atividade sistêmica da doença onde o repouso é aconselhável; indicar a adoção de uma dieta balanceada, evitando excesso de sal, carboidratos e lipídios; evitar o tabagismo.

Ainda de acordo com Sato et al. (2002) considerando que a radiação ultravioleta B é a principal causadora de fotossensibilidade e desencadeante das lesões cutâneas do LES, protetores solares com FPS 15 ou mais devem ser utilizados pela manhã e reaplicados mais de uma vez ao dia. O uso de bloqueadores solares de amplo espectro pode trazer benefício adicional pela capacidade de proteção contra UVA em algumas lesões cutâneas, como as lesões subagudas.

Não há um tratamento específico para o LES uma vez que não existe protocolo padrão para todos os pacientes. A avaliação da atividade da doença no LES é crucial para o médico, uma vez que constitui a base para as decisões do tratamento. Dessa forma, uma série de medidas entre medicamentos e normas para que se tenha uma boa qualidade de vida são empregadas (Omonte; Lenz; Batista, 2006).

Vários são os tipos de drogas empregadas, incluindo analgésicos, anti-inflamatórios não-hormonais, corticosteroides, imunomoduladores e agentes biológicos. Quando a intervenção acontece no início dos sintomas, antes da ocorrência de danos teciduais permanentes, os medicamentos podem ser eficazes, embora com efeitos secundários significativos. Para as manifestações cutâneas e articulares são utilizados medicamentos não-esteróides, antimalárico, com a hidroxicloroquina, e baixas a moderadas doses de

corticosteroides, sendo esses muitas vezes suficientes. Para doenças moderadamente graves, tais como erupções cutâneas persistentes, pleurite e artrite severa, doses elevadas de corticosteróides são usadas, aliado a um medicamento imunossupressor, como o metotrexato ou azatioprina. E no caso de manifestações mais graves a órgãos vitais, como rim e sistema nervoso, medicamentos citotóxicos como a ciclofosfamida são usados (Papadimitraki; Boumpas, 2007; Houssiau; Ginzler, 2008).

Segundo Assis e Baaklini (2009), o tratamento visa restabelecer a homeostase imunológica, controlando os sintomas e preservando os órgãos, evitando-se também os efeitos colaterais de um tratamento medicamentoso prolongado. Com os progressos no tratamento tem ocorrido redução das lesões teciduais e aumento considerável da sobrevida dos pacientes, mas as complicações infecciosas ainda são preocupantes e, em pacientes de maior faixa etária, elevam-se os riscos de doenças cardiovasculares.

2.7. Fatores Genéticos envolvidos na Susceptibilidade ao LES

O desenvolvimento do LES está associado a uma forte base genética, uma vez que a doença apresenta alta herdabilidade, maior que 66%. Estudos de concordância com gêmeos monozigóticos e dizigóticos (Block, 2006), incidência em parentes de primeiro e segundo graus (Alarcon-Segovia et al., 2005) e entre irmãos (Deng; Tsao, 2010) são indícios que confirmam a importância do componente genético para o desenvolvimento do LES. Muitos trabalhos de ligação e associação indicam também que várias regiões do genoma estão associadas com a doença. Além disso, diferenças na susceptibilidade por parte de diferentes grupos étnicos sugerem que a diversidade genética pode alterar a probabilidade de desenvolvimento do LES (Tiffin; Adeyemo; Okpechi, 2013).

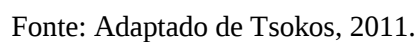
Embora em raros casos, o LES pode estar associado a uma deficiência em um único gene (por exemplo, os componentes do sistema complemento C1q e C4), no entanto, a doença resulta comumente a partir do efeito combinado de diversos polimorfismos de base única (SNPs) em um grande número de genes. A complexidade genética nessa doença poligênica está relacionada à baixa penetrância de cada gene contribuinte (Bertsias; Cervera; Boumpas, 2012). Cada alelo contribui com um pequeno efeito, mas é o acúmulo de várias mutações que aumentam de forma significativa o risco ao LES. Entretanto, as combinações de alelos de risco que levam à predisposição e os mecanismos através dos quais eles contribuem na autoimunidade são pouco compreendidos. A maioria dos SNPs associados ao LES encontra-se em regiões não-codificadoras do DNA de genes relacionados à resposta imune e representam marcadores de alelos co-segregados (Tsokos, 2011).

Estudos de genes candidatos, estudos de ligação baseados em análise familiar e de associação genômica em larga escala (GWAS) vêm sendo utilizados na tentativa de determinar a predisposição genética ao LES. Todos esses estudos apontam para a existência de um sistema complexo, no qual múltiplos genes da resposta imune inata ou adaptativa aparecem associados à doença. A identificação dos genes de susceptibilidade pode fornecer, então, importantes informações de como a autoimunidade, em especial o LES, progride e quais suas causas (Sestak et al., 2007).

A região cromossômica 6p21 a qual compreende o complexo de histocompatibilidade humano (HLA) e codifica mais de 200 genes, a maioria com funções imunológicas, foi a primeira associação genética descrita no LES (Goldberg et al., 1976). A maioria dos genes do HLA estudados até hoje são de classe II, como o HLA-DR2 e o HLA-DR3, os quais mostraram consistentes associações com o LES em várias populações europeias com o dobro do risco de desenvolvimento da doença para cada alelo (Tsao et al., 2003).

Por ser a perda da tolerância imunológica a base da etiologia do LES, muitos genes que codificam proteínas com funções regulatórias ou adaptativas estão sendo considerados como candidatos. Entre eles podemos destacar o gene *CTLA-4* (cytotoxic T lymphocyte antigen-4), localizado na região cromossômica 2q33 e descrito como um importante regulador negativo de doenças autoimunes (Pullmann et al., 1999). Outro gene relacionado é o *PDCD-1* (programmed cell death-1), localizado na região cromossômica 2q37, que contém um imunorreceptor citoplasmático o qual é expresso na superfície de células T e B ativadas e sua associação genética com LES foi confirmada em estudos familiares (Prokunina et al., 2002), além disso, é um gene igualmente associado à nefrite lúpica (Johansson et al., 2005). Yang et al. (2007) relataram polimorfismos no gene do componente do complemento C4 associados ao aumento significativo do risco de susceptibilidade à doença em pacientes que apresentaram menos cópias de C4 total.

Além desses, genes como o *IRF5*, *STAT4*, *osteopontina*, *IRAK1*, *TREX1* e *TLR8*, envolvidos na detecção de ácidos nucléicos e na produção de interferon (IFN), também surgem como candidatos, junto com os genes *PTPN22* e *TNFSF4* envolvidos nas vias de sinalização das células T e *BANK1*, *BLK*, *LYN* envolvidos nas vias de sinalização das células B (Gregersen; Olsson, 2009; Tsokos, 2011). A figura 4 mostra os *loci* e genes associados ao LES, divididos em seis categorias de acordo com as funções dos genes.



Um estudo na população europeia encontrou a associação de polimorfismos no gene *BANK1* (Proteína de célula B com repetições de anquirina) com a susceptibilidade ao LES. Esse gene codifica uma proteína adaptadora que faz parte da ativação de células B (Kozyrev et al., 2008). Os polimorfismos rs10516487 (G>A), rs17266594 (T>C) e rs3733197 (G>A) nesse gene podem contribuir com a manutenção da ativação dos receptores de células B e,

consequentemente, com a hiperatividade dessas células, comumente observada nos pacientes com LES (Yokoyama et al., 2002).

O gene *PTPN22* codifica uma proteína que inibe a atividade de linfócitos T e apresenta um SNP não-sinônimo (rs2476601), no códon 620, que está associado com a susceptibilidade a diversas doenças autoimunes, incluindo o LES (Gregersen; Olsson, 2009). Esse polimorfismo resulta na substituição de um aminoácido (620Arg>Trp) que aumenta a atividade da proteína, o que reduz a sinalização desencadeada pelos receptores de células T. Essa sinalização reduzida induz a autoimunidade através de alterações na seleção de linfócitos autorreativos e redução da atividade e do número de células Tregs (Rieck et al., 2007; Siggs et al., 2007).

Um dos mais importantes genes de susceptibilidade a doenças autoimunes é o *CTLA-4*. A proteína codificada por esse gene é expressa na superfície de linfócitos T ativados com uma função regulatória inibitória sobre essas células (Teft et al., 2006). Os polimorfismos do *CTLA-4* mais estudados e considerados como associados ao LES em diferentes populações são T>C na posição -1722, C>T na posição -138 e A>G na posição 49 do éxon 1 (Barreto et al., 2004; Lee et al., 2005; Ulker et al., 2009; Taha Khalaf et al., 2011).

Além de estudos genéticos de associação de polimorfismos com o desenvolvimento do LES, estudos de expressão gênica também vêm sendo realizados para a identificação de genes candidatos que possam ser úteis para o entendimento da patogênese, diagnóstico e prognóstico do LES. Sandrin-Garcia et al. (2009) avaliaram o perfil de expressão gênica de 4500 genes comparando pacientes com LES nas fases ativa e inativa da doença e controles saudáveis. Um total de 156 genes mostrou-se diferencialmente expresso quando comparados os pacientes aos controles. Desses 156 genes, 104 estavam relacionados aos pacientes com LES em atividade, sendo 80 reprimidos e 24 induzidos, e 52 estavam relacionados com os pacientes na fase de inatividade da doença, sendo 31 induzidos e 21 reprimidos. Entre esses genes, estão o *FYB* (Proteína ligante de Fyn), *FYN* (Fyn tirosina cinase), *SEMA4A* (Semaforina 4A), *STK17A* (Serina treonina cinase 17 A), *SLC38A1* (Membro 1 da família carreadora de soluto 38), *PGBD3* (Derivado 3 do elemento transponível PiggyBac), *PANK1* (Cinase pantotenato 1), *CSNK1G3* (Caseína cinase 1 gama 3) e *VPS4B* (Proteína vacuolar homóloga a 4B).

Dessa forma, fica evidente o quanto a genética do LES é complexa e precisa ser investigada. O conhecimento de quais genes estão envolvidos na doença e quais variações são capazes de alterar o produto destes genes pode vir a contribuir para o esclarecimento da etiopatogênese da doença.

2.8. O complexo Inflamassoma

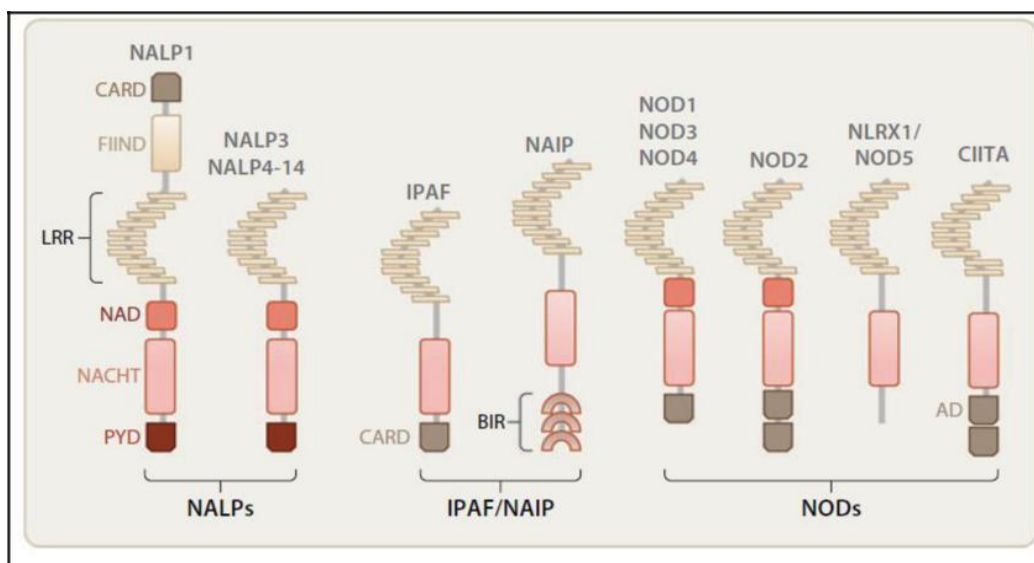
O sistema imune inato desempenha um papel fundamental no rápido reconhecimento e eliminação de microorganismos invasores, através de diferentes processos, tais como a fagocitose e a indução da inflamação. Vital igualmente na estimulação e ativação do sistema imune adaptativo, proporcionando uma imunidade duradoura ao hospedeiro (Abbas; Lichtman; Pillai, 2008).

As células imunes, além das linhagens mesoteliais e epiteliais, expressam receptores de reconhecimento padrão (PRRs), responsáveis pela identificação de moléculas conservadas tipicamente associadas a patógenos (PAMPs), como peptidoglicano e RNA de fita dupla, ou a moléculas associadas ao dano celular do hospedeiro (DAMPs), como ATP extracelular, DNA próprio e cristais de urato monossódico, ativando diferentes vias inflamatórias e antimicrobianas. Os PRRs incluem receptores trans-membrana do tipo Toll (TLRs), receptores de lectina tipo C (CLRs), receptores citosólicos tipo Nod (NLRs), helicases tipo gene induzido por ácido retinóico I (RIG-I) e proteínas HIN200 (O'Neill; Bowie, 2010; Takeuchi; Akira, 2010), encontrados principalmente em fagócitos e células dendríticas, sendo os principais gatilhos da imunidade inata.

Estes receptores reconhecem e respondem a sinais endógenos de perigo, derivados do hospedeiro, que são liberados em resposta ao estresse, lesão tecidual ou morte celular (Medzhitov, 2008; Schroder; Tschopp, 2010).

Os receptores NLRs, em especial, são um grupo de proteínas codificadas por 22 genes em humanos, o qual pode ser dividido em três subfamílias: NOD, NLRP e IPAF (Schroder; Tschopp, 2010). Proteínas pertencentes ao grupo dos NLRs são receptoras intracelulares com três domínios característicos, sendo eles: uma região N-terminal de interação proteína-proteína, a exemplo do domínio pirina (PYD) e do domínio de recrutamento de caspase (CARD), relacionada ao recrutamento de moléculas efetoras na via de sinalização, um domínio central de ligação e oligomerização de nucleotídeos (NOD ou NAHCT), responsável pela atividade dNTPase, e se liga especificamente ao ATP e por fim uma região C-terminal, que nos NLRs é uma série de repetições ricas em leucina (LRRs) responsável pelo reconhecimento da molécula antigênica (Martinon; Mayor; Tschopp, 2009) (Figura 5).

Figura 5. Representação da organização da família dos receptores do tipo NOD (NLRs). A família NLR é caracterizada pela presença de três domínios distintos. São eles: domínio C-terminal LRR, domínio central NACHT e domínio N-terminal PYD ou CARD ou BIR. A família NLR pode ser subdividida em três subfamílias a depender de sua estrutura molecular em: NALPs, IPAF/NAIP e NODs.

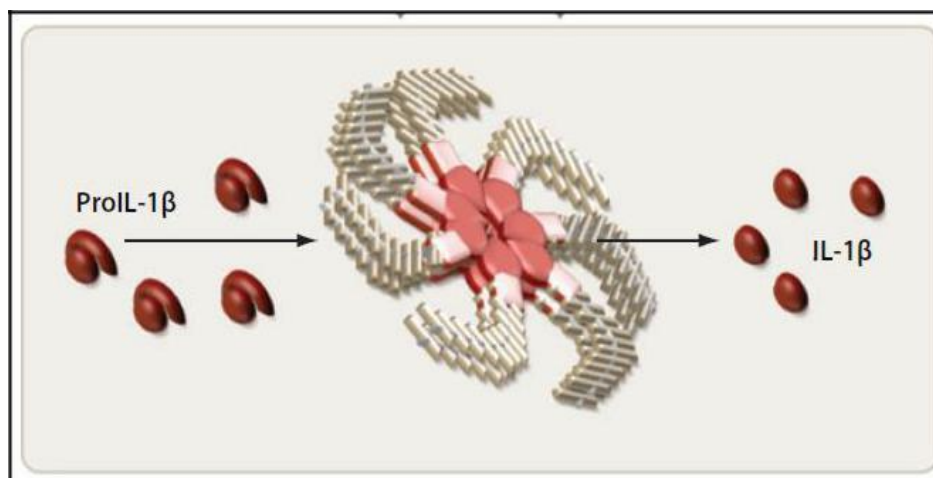


Fonte: Martinon; Mayor; Tschopp, 2009.

Estudos mais aprofundados a cerca da família NLR revelaram que alguns de seus membros são capazes de formar complexos multiprotéicos, denominados inflamassomas, que são ativados por infecções ou estresse celular, e responsáveis pelo recrutamento da procaspase-1, ativando-a diretamente ou através de proteínas adaptadoras associadas à apoptose (ASC). A formação do inflamassoma ocorre após a ativação dos NLRs por meio de suas interações homotípicas com moléculas adaptadoras e efetoras, a ASC e a procaspase-1, respectivamente. O recrutamento da procaspase-1, tanto por ligação à ASC quanto por ligação ao NLR diretamente, causa uma catálise por aproximação, gerando uma protease ativa (Fernandes-Alnemri et al., 2009; Martinon; Mayor; Tschopp, 2009).

A caspase-1 é uma proteína pertencente à família das caspases, as quais utilizam a cisteína presente em seus sítios ativos para a clivagem de outras proteínas em um sítio após resíduos de aspartato. A atividade mais descrita para a caspase-1 ativa é a clivagem da pró-IL-1 β e pró-IL18, de forma que a via de sinalização dos NLRs pelo inflamassoma culmina com a secreção das citocinas IL-1 β e IL-18 ativas (figura 6). Para essa via ocorrer, as moléculas pró-IL-1 β e pró-IL-18 precisam estar anteriormente presentes no citoplasma celular, e a produção dessas pró-citocinas é dependente de um primeiro sinal via NF- κ B, o qual pode ser induzido por sinalização via TLRs ou via TNF (Fernandes-Alnemri et al., 2009).

Figura 6. Organização estrutural durante a formação do inflamassoma. Após a sinalização do inflamassoma, as proteínas envolvidas formam um complexo multiproteico culminando na ativação de citocinas pro-inflamatórias.



Fonte: Martinon; Mayor; Tschopp, 2009.

Há um grande número de receptores NLRs associados à montagem do inflamassoma, porém apenas poucos foram fisiologicamente descritos, dentre eles os inflamassomas de NLRP3, NLRP1 e NLRC4 (Agostini et al., 2004; Martinon; Burns; Tschopp, 2002; Poyet et al., 2001). A proteína AIM2, embora não estruturalmente relacionada aos NLRs e pertencente à família HIN-200, também foi descrita como formadora de inflamassomas (Fernandes-Alnemri et al., 2009).

A desregulação e/ou mutações ou variações em genes codificantes dos componentes do inflamassomas tem sido relacionados a doenças humanas, incluindo síndromes autoinflamatórias contínuas, síndrome Muckle-Welss, doença de Crohn, sepse e infecções a diversos patógenos (Rodrigue-Gervais; Saleh, 2010).

Os receptores NLRs formadores de inflamassomas são importantes no reconhecimento de PAMPs e DAMPs intracelulares e na geração de uma resposta imune correspondente. Nesse sentido, atuam de diversas formas quanto ao reconhecimento e tipo de molécula reconhecida. O NLRP1 é ativado na presença da toxina letal de *Bacillus anthrax* (Faustin et al., 2007; Liao; Mogridge, 2009). A proteína AIM2 se liga a DNA de fita dupla, e acredita-se que esse inflamassoma detecta a presença citosólica do dsDNA (Fernandes-Alnemri et al., 2009). O NLRC4, antes entendido como um receptor de inflamassoma deve ser visto como um adaptador, semelhante à ASC, por meio do qual é transmitido o sinal de diversos inflamassomas a ele, culminando na ativação da caspase-1. O NLRP3, também chamado de Criopirina ou NALP3, cliva a procaspase-1 via ASC e pode ser ativado por diversos agonistas, tanto endógenos quanto exógenos, como ATP, cristais de colesterol e alumínio e a acidose

extracelular (Davis; Wen; Ting, 2011; Rajamäki et al., 2013). Da mesma forma, patógenos que entram no citosol, como *Neisseria gonorrhoeae*, o vírus influenza A e *Candida albicans* são capazes de ativar o inflamassoma NLRP3, assim estímulos físicos como a exposição à radiação ultravioleta (Allen et al., 2009).

2.8.1. Polimorfismos dos Genes das Proteínas do Inflamassoma

Nos últimos anos, é possível perceber um progresso significativo na compreensão de como os inflamassomas contribuem na patologia molecular de múltiplas doenças autoinflamatórias e autoimunes (Martinon; Mayor; Tschopp, 2009). O gene *NLRP1*, também conhecido como *NALP1* está localizado no braço curto do cromossomo 17 na região 13.2 (17p13.2). Os seres humanos expressam o NLRP1 a partir de um único gene, enquanto que no genoma murino existem três parálogos em tandem (*Nlrp1a*, *Nlrp1b*, e *Nlrp1c*). Este gene codifica um membro das proteínas apoptóticas da família Ced-4 que contêm um domínio de recrutamento para caspase (CARD) e são conhecidos por serem mediadores-chaves da morte celular programada. O *NLRP1* contém um motivo N-terminal PYD envolvido na interação proteína-proteína, possivelmente com a ASC, e interage com caspases inflamatórias (caspase-1 e 5) e com apoptóticas (caspase-2, 3 e 9) (Martinon; Burns; Tschopp, 2002).

Apesar da sua expressão em leucócitos, o *NLRP1* parece estar amplamente expresso em vários tecidos epiteliais, em neurônios e oligodendrócitos. Polimorfismos no gene *NLRP1* foram recentemente associados com várias condições patológicas do cérebro, sugerindo que este gene, em virtude do seu importante papel na sinalização inflamatória, pode contribuir na predisposição genética a doenças multifatoriais. O referido gene também tem sido associado com risco ao desenvolvimento de algumas doenças inflamatórias, tais como vitiligo, doença autoimune de Addison e LES (Jin et al., 2007, Zurawek et al., 2010, Pontillo et al., 2012).

Polimorfismos no promotor e regiões codificadoras do gene *NLRP1* estão relacionados com o aumento da incidência de vitiligo (Jin et al., 2007) e doença de Addison (Zurawek et al., 2010), respectivamente. Segundo Jin et al (2007), a maioria dos SNPs identificados no gene *NLRP1* está localizada dentro ou ao redor do domínio central NACHT, comprometendo a formação do inflamassoma e consequentemente a produção de IL-1 β .

O NLRP3 é um NLR que também participa na formação do inflamassoma através do recrutamento de ASC e subsequente ativação de caspase-1, com secreção de IL-1 β e IL-18. O inflamassoma de NLRP3 é de longe o mais bem estudado de todos os inflamassomas e pode ser ativado por diversos tipos de estímulos tais como moléculas derivadas de patógenos, sinais endógenos e de origem ambiental (Bauernfeind et al., 2009).

Diferente dos outros NLRs ativadores do inflamassoma, NLRP3 é expresso em baixas quantidades em células apresentadoras de antígenos, tais como macrófagos e células dendríticas. Consequentemente, um aumento na expressão de NLRP3 mediado pela ativação de NF- κ B é crítica para a ativação desse inflamassoma (Bauernfeind et al., 2009).

O gene *NLRP3* está localizado no braço longo do cromossomo 1 (1q44) (Hitomi et al., 2009) e vários polimorfismos já foram descritos para o gene, associados principalmente a doenças inflamatórias, tais como psoríase (Carlstrom et al., 2012), artrite reumatoide (Kastbom et al., 2008), diabetes tipo 1 (Pontillo et al., 2010), doença de Crohn (Villani et al., 2009) e doença celíaca (Pontillo et al., 2011).

Como no caso do gene *NLRP1*, mutações de ganho-de-função dentro ou próximas ao domínio central NACHT no gene *NLRP3* têm sido associadas com um amplo espectro de doenças hereditárias autoinflamatórias, principalmente às pertencentes ao grupo denominado CAPS, síndrome periódica associada à criopirina (Bauernfeind et al., 2009). Outro conjunto de SNPs no promotor de *NLRP3* tem sido associado com o aumento da susceptibilidade à doença de Crohn. Estes polimorfismos causam uma diminuição da expressão de *NLRP3*, reduzindo a produção de IL-1 β (Villani et al. 2009).

O outro receptor da família NLR, o NLRC4, é mais um componente-chave do complexo inflamassoma que indiretamente detecta proteínas específicas de bactérias patogênicas e fungos. O gene *NLRP4* é constituído por 9 éxons, em um total de 41.3kb localizado no cromossomo 2p21-p22. Este gene codifica uma proteína de 1024 resíduos com uma massa molecular prevista de 112kDa (Romberg et al., 2014). Modelos murinos deficientes em *NLRP4* apresentaram maior proteção contra a formação de tumores (Hu et al. 2013), confirmando o papel-chave da ativação dos inflamassomas na regulação da homeostase do intestino e na tumorigênese do cólon.

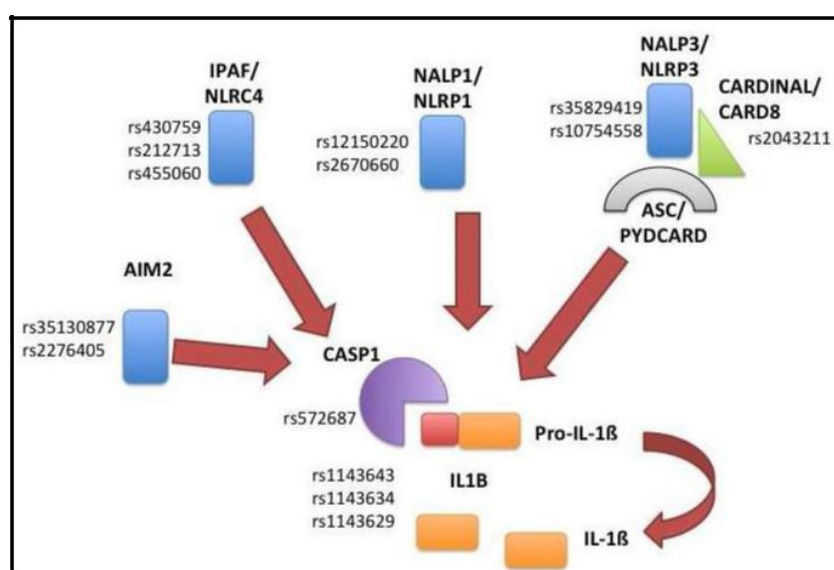
O inflamassoma de AIM2 foi o primeiro membro da família HIN200 ligado às funções do inflamassoma e está localizado no citosol onde reconhece dsDNA de vírus e bactérias (Burckstummer et al., 2009; Hornung et al., 2009). Outros trabalhos demonstraram que o AIM2 é importante para a ativação de caspase-1 em macrófagos infectados com *Francisella tularensis* e em resposta ao DNA de vírus, tais como citomegalovírus e vaccínia (Fernandes-Alnemri et al., 2009).

Se a ativação inflamassoma desempenha um papel na progressão ao LES, então o gene *AIM2* parece ser um bom candidato, com base na sua capacidade em reconhecer DNA citoplasmático (Hornung et al., 2009). No entanto, o envolvimento de AIM2 ou quaisquer outros NLRs envolvidos no inflamassoma e a susceptibilidade ao LES ainda é pouco estudado, reforçando a importância de mais estudos nesta área.

Polimorfismos no gene *IL-18* têm sido igualmente correlacionados com uma maior susceptibilidade à doença de Crohn (Tamura et al., 2002). Semelhantemente, tanto a IL-1 β quanto a IL-18 estão envolvidos na progressão do LES em modelos murinos, sugerindo o envolvimento de pelo menos um inflamassoma na doença (Martinon; Burns; Tschopp, 2002).

A importância da sinalização do inflamassoma e sua proteção contra a inflamação do cólon foi confirmada em modelos murinos deficientes em ASC e caspase-1 (Allen et al., 2010), bem como em animais sem IL-1 β e IL-18 ou os seus respectivos receptores (Takagi et al. 2003; Salcedo et al., 2010). A figura 7 ilustra os principais genes envolvidos na formação do complexo inflamassoma e seus respectivos polimorfismos.

Figura 7. Representação esquemática dos SNPs dentro dos componentes do inflamassoma.



Fonte: Pontillo et al., 2012.

3. Justificativa

O LES é uma doença caracterizada pela geração de uma resposta imune inadequada direcionada contra autoantígenos, influenciada por muitos fatores ainda não totalmente esclarecidos e apresentando uma ampla variedade de manifestações clínicas. Citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e a IL-18 possuem papel importante na patogenicidade de doenças autoimunes, quando produzidas de maneira desequilibrada. Tal desequilíbrio pode ser devido à presença de mutações nos genes envolvidos na codificação de proteínas responsáveis pela ativação destas citocinas, conhecidas como complexo inflamassoma. A forte associação entre alterações nos componentes do inflamassoma e doenças autoimunes sugere um papel proeminente entre o conteúdo genético do indivíduo e sua relação sobre as manifestações clínicas e prognóstico destas doenças.

Em estudos anteriores, Pontillo et al. (2012) avaliaram a relação entre 14 SNPs em 7 genes do inflamassoma (*NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL1B*) e a susceptibilidade ao LES em uma população do sudeste do Brasil. Os autores demonstraram que polimorfismos no gene *NLRP1* estavam relacionados com uma maior susceptibilidade à doença, e em particular com o desenvolvimento da nefrite lúpica. No entanto, a falta de análises de expressão destes genes no referido trabalho pode representar uma limitação sobre como o complexo inflamassoma se comporta na patogênese do LES.

Diante deste contexto, nosso grupo de pesquisa vem buscando estudar variantes genéticas informativas para um diagnóstico prévio e prognóstico de doenças multifatoriais, como no caso do LES. Dentre os diversos estudos já realizados pelo nosso grupo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel de variantes genéticas e o perfil de expressão dos genes codificantes do complexo inflamassoma como um possível marcador preditivo para o diagnóstico do LES na população pernambucana, visando compreender os mecanismos patogênicos de autoimunidade da doença.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Investigar o papel dos polimorfismos e o perfil de expressão dos genes do inflamassoma no Lúpus Eritematoso Sistêmico, doença com forte componente inflamatório, em pacientes do Estado de Pernambuco, e a sua atuação na modulação do fenótipo patológico.

4.2. Objetivos Específicos

1. Descrever a distribuição das frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas de genes do inflamassoma (*NLRP1*, *NALP3*, *NALP4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL1B* e *IL18*) entre pacientes com LES e o grupo de indivíduos controle;
2. Avaliar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos polimorfismos e suas relações com as manifestações clínicas do LES;
3. Avaliar a expressão gênica dos componentes do inflamassoma (*NLRP1*, *NALP3*, *NALP4*, *AIM2*, *CARD8*, *ASC* e *IL1B*) entre os grupos estudados;
4. Avaliar a atividade do inflamassoma, através da dosagem de IL-1 β , no grupo de pacientes com LES e no grupo controle;

5. Referências Bibliográficas

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. Cellular and molecular immunology. 6th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Agostini, L. et al. NALP3 forms an IL-1 β -processing inflammasome with increased activity in muckle-wells autoinflammatory disorder. *Immunity*, v. 20, p. 319-325, 2004.

Alarcón G S, Calvo-Alén J, McGwin G, Jr, Uribe A, Toloza S M A, Roseman J M. et al Systemic lupus erythematosus in a multiethnic cohort: LUMINA XXXV. Predictive factors of high disease activity over time. *Ann Rheum Dis* 2006. 65:1168–1174.

Alarcon-Segovia D, Alarcon-Riquelme ME, Cardiel MH, Caeiro F, Massardo L, Villa AR, Pons-Estel BA: Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis Rheum* 2005, 52 (4):1138–1147.

Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, Guthrie EH, Pickles RJ, Ting JP. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity*. 2009 Apr 17;30(4):556-65.

Allen, IC, TeKippe, E.M., Woodford, R.M., Uronis, J.M., Holl, E.K., Rogers, A.B., Herfarth, H.H., Jobin, C., Ting, J.P. The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer *J. Exp. Med.*, 207 (2010), pp. 1045–1056.

Apostolidis SA, Lieberman LA, Kis-Toth K, Crispín JC, Tsokos GC (2011) The dysregulation of cytokine networks in systemic lupus erythematosus. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 31: 769–79.

Arbuckle, M.R. et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, v.349, n.16, p.1526-1533, 2003.

Assis, M.R., Baaklini, C.E. Como Diagnosticar e Tratar Lúpus eritematoso sistêmico. *Revista Brasileira de Medicina*, 2009.

Barreto M, Santos E, Ferreira R, Fesel C, Fontes MF, Pereira C, Martins B, Andreia R, Viana JF, Crespo F, Vasconcelos C, Ferreira C, Vicente AM (2004) Evidence for CTLA4 as a susceptibility gene for systemic lupus erythematosus. *Eur J Hum Genet* 12:620-6.

Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, et al. (2009) Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 183: 787–791.

Bertsias, G., Cervera, R., Boumpas, DT. Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis and Clinical Features. *Eular Textbook on Rheumatic Diseases*. London: BMJ, 2012, p. 476-505.

Block SR: A brief history of twins. *Lupus* 2006, 15(2):61–64.

Borchers AT, Leibushor N, Naguwa SM, Cheema GS, Shoenfeld Y, Gershwin ME (2012) Lupus nephritis: A critical review. *Autoimmunity reviews ii*: S1568- 9972(12)00197-8.

Burckstummer, T. et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat. Immunol.* 10, 266–272 (2009).

Cameron, JS. Systemic lupus erythematosus. In Nielson, E.G, Couser, W.G. (eds). *Immunologic renal disease*, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, p. 1057-104. 2001.

Carlstrom, M., Ekman, A.K., Petersson, S., Soderkvist, P., Enerback, C., 2012. Genetic support for the role of the NLRP3 inflammasome in psoriasis susceptibility. *Exp. Dermatol.* 21, 932–937.

Cazenave P, Schedel HE. *Abrégé pratique des maladies de la peau*. 3rd ed. Paris: Béchet jeune. 1838.

Choi J, Kim ST, Craft J (2012) The pathogenesis of systemic lupus erythematosus-an update. *Current opinion in immunology pii*: S0952-7915(12)00161-6.

Cojocaru, M. et al. Manifestations of systemic lupus erythematosus. *Maedica*, v.6, n.4, p.330-3366, 2011.

Crispín JC, Kyttaris V, Juang YT, Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus: new molecular targets. *Ann Rheum Dis* 2007;66:65–9.

Crispín JC, Liossis SC, Kis-Toth K, Lieberman LA, Kyttaris VC, Juang Y e Tsokos GC (2010) Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med* 16: 47–57.

Crow MK. Collaboration, genetic associations, and lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2008;358(9):956–961.

Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus*. 2006;15(5):308-18.

Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:707-35.

Deng Y, Tsao BP: Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol* 2010, 6(12):683–692.

Drake CG and Kotzin BL. Genetic and immunological mechanisms in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol*. 1992 Dec;4(6):733-40.

Faustin, B., Lartigue, L., Bruey, J.M., Luciano, F., Sergienko, E., Bailly-Maitre, B., Volkmann, N., Hanein, D., Rouiller, I., and Reed, J.C. (2007). Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* 25, 713-724.

Fernandes-Alnemri, T. et al. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature*, v. 458, n. 7237, p. 509-13, 2009.

Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, Bacon P, Bombardieri S, Hanly J, Hay E, Isenberg D, Jones J, Kalunian K, Maddison P, Nived O, Petri M, Richter M, Sanchez-Guerrero J, Snaith M, Sturfelt G, Symmons D, Zoma A (1996) The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 39 (3):363-369.

Goh, Y.P., Naidoo P., Ngian G.S. Imaging of systemic lupus erythematosus. Part II: Gastrointestinal, renal, and musculoskeletal manifestations. *Clin Radiol.*, v.68, n.2, p.192-202, 2012.

Goldberg MA, Arnett FC, Bias WB, Shulman LE (1976) Histocompatibility antigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2:129-32;

Graham RR et al. (2006) A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 38:550–555.

Gregersen PK, Olsson, LM (2009) Recent advances in the genetics of autoimmune disease. *Annu Rev Immunol* 27:363–391.

Gualtierotti R., Biggioggero M., Penatti AE, P.L. Meroni. Updating on the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2010;10(1):3-7.

Hitomi, Y., et al., 2009. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124 (779–785), e776.

Hochberg, MC (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40 (9):1725.

Holubar K. History of lupus erythematosus. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2006 Dec;15(4):191-4.

Hom G, Graham RR, Modrek B, et al. Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAMITGAX. *N Engl J Med* 2008;358(9):900–909.

Hornung, V. et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458, 514–518 (2009).

Houssiau FA, Ginzler EM. Current treatment of lupus nephritis. *Lupus.* 2008; 17:426–430.

Hu, Z., C. Yan, P. Liu, Z. Huang, R. Ma, C. Zhang, R. Wang, Y. Zhang, F. Martinon, D. Miao, et al. 2013. Crystal structure of NLRC4 reveals its autoinhibition mechanism. *Science*. 341:172–175.

Jin, Y., Mailloux, C. M., Gowan, K., Riccardi, S. L., Laberge, G., Bennett, D. C., Fain, P. R. & SPRITZ, R. A. 2007. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med*, 356, 1216-25.

Johansson M, Arlestig L, Möller B, Rantapää-Dahlqvist S. Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2005 Jun;52(6):1665-9.

Kastbom, A., Verma, D., Eriksson, P., Skogh, T., Wingren, G., Söderkvist, P. Genetic variation in proteins of the cryopyrin inflammasome influences susceptibility and severity of rheumatoid arthritis (The Swedish TIRA project). *Rheumatology* Volume 47, Issue 4, 2008, Pages 415-417.

Kozyrev SV, Abelson AK, Wojcik J, Zaghlool A, Linga Reddy MV, Sanchez E, Gunnarsson I, Svenungsson E, Sturfelt G, Jönsen A, Truedsson L, Pons-Estel BA, Witte T, D'Alfonso S, Barizzone N, Danieli MG, Gutierrez C, Suarez A, Junker P, Laustrop H, González-Escribano MF, Martin J, Abderrahim H, Alarcón-Riquelme ME (2008) Functional variants in the B-cell gene BANK1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 40: 201-6.

Kyttaris VC. Systemic lupus erythematosus: from genes to organ damage. *Methods Mol Biol*. 2010;662:265-83.

Lalani, T.A. et al. Imaging findings in systemic lupus erythematosus. *Radiographics*, v.24, n.4, p.1069-86, 2004.

Laskin CA, Haddad G, Soloninka CA. The regulatory role of NZB T lymphocytes in the production of anti-DNA antibodies in vitro. *J Immunol*. 1986; 137(6):1867-73.

Lee YH, Harley JB, Nath SK (2005) CTLA-4 polymorphisms and systemic lupus erythematosus (SLE): a meta-analysis. *Hum Genet* 16: 361-367.

Liao KC, Mogridge J. Expression of Nlrp1b inflammasome components in human fibroblasts confers susceptibility to anthrax lethal toxin. *Infect Immun*. 2009 Oct;77(10):4455-62.

Louis, P.J., Fernandes R. Review of systemic lupus erythematosus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.91, n.5, p.512- 6, 2001.

Manderson AP, Botto M, Walport J (2004) The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 22:431–456.

Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:229-65.

Martinon, F., Burns, K.; Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proILb. *Molecular Cell*, v. 10, p. 417–426, 2002.

Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008.

Mendes ASL (2010) Fatores Predisponentes ao desenvolvimento do lúpus eritematoso sistêmico e sua importância na prática clínica. Tese de Doutorado.

Nakashima CAK, Galhardo ANP, Silva JFM, Fiorenzano GR, Santos ABS, Leite MFS, Nogueira MA, Menolli PVS, Menolli RA (2011) Incidência e aspectos clínico laboratoriais do lúpus eritematoso sistêmico em cidade do Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Reumatologia* 51: 231-9.

Nath, SK, Kilpatrick J, Harley JB (2004) Genetics of human systemic lupus erythematosus: the emerging picture. *Current Opinion in Immunology* 16:794–800.

Niewold TB, Hua J, Lehman TJ, Harley JB, Crow MK (2007) High serum INFalpha activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 8:492-502.

O'Neill LA and Bowie AG (2010) Innate immune sensing of nucleic acids. *Current Biology* 20(7):R328-33.

Omonte, R.K; Lenz, M.A.S; Batista, J.S. Lúpus Eritematoso: Uma revisão de literatura. CIPRE- Centro Integrado de Saúde Profº Roberto Elias. 2006.

Papadimitraki, E.; Boumpas, DD. Cytotoxic drug treatment. In: Tsokos, GC.; Gordon, C.; Smolen, JS., editors. Systemic lupus erythematosus: a companion to Rheumatology. 1. Mosby Inc; Philadelphia: 2007. p. 498-510.

Petri M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. Best Pract Res Clin Rheumatol. 2002; 16: 847-58.

Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. Seminars in arthritis and rheumatism. Elsevier Inc.; 2010;39(4):257–68.

Pontillo A, Brandão LA, Guimarães RL, Segat L, Athanasakis E, Crovella S. A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. J Acquir Immune Defic Syndr. 2010 Jul 1;54(3):236-40. PubMed PMID: 20502346.

Pontillo A, Girardelli M, Kamada AJ, Pancotto JA, Donadi EA, Crovella S, Sandrin-Garcia P. Polimorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. Autoimmunity. 2012 Jun;45(4):271-8.

Pontillo, A., Brandao, L., Guimaraes, R., Segat, L., Araujo, J., Crovella, S., 2010. Two SNPs in *NLRP3* gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil. Autoimmunity 43, 583–589.

Pontillo, A., Vendramin, A., Catamo, E., Fabris, A., Crovella, S., 2011. The missense variation Q705K in CIAS1/NALP3/NLRP3 gene and an NLRP1 haplotype are associated with celiac disease. Am. J. Gastroenterol. 106, 539–544.

Poyet, J. L. et al. Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. The Journal of Biological Chemistry, v. 276, n. 30, p. 28309-13, 2001.

Prokunina L, Castillejo-Lopez C, Oberg F, Gunnarsson I, Berg L, Magnusson V, et al. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat Genet* 2002;32:666–9.

Pullmann R Jr, Lukac J, Skerenova M, Rovensky J, Hybenova J, Melus V, Celec S, Pullmann R, Hyrdel R (1999) Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) dimorphism in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 17:725–729.

Rajamäki K, Nordström T, Nurmi K, Åkerman KE, Kovanen PT, Öörni K, Eklund KK. Extracellular acidosis is a novel danger signal alerting innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *J Biol Chem*. 2013 May 10;288(19):13410-9.

Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, de Bakker PI, Le JM, Lee HS, Batliwalla F, Li W, Masters SL, Booty MG, Carulli JP, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L, Chen WV, Amos CI, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Gregersen PK (2007) STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 357:977–986.

Rieck M, Arechiga A, Onengut-Gumuscu S, Greenbaum C, Concannon P, Buckner JH (2007) Genetic variation in PTPN22 corresponds to altered function of T and B lymphocytes. *J. Immunol* 179:4704–4710.

Rodrigue-Gervais IG, Saleh M. Genetics of inflammasome-associated disorders: A lesson in the guiding principles of inflammasome function. *European Journal of Immunology*. 2010;40 (3):643–648.

Romberg N, et al. Mutation of NLRC4 causes a syndrome of enterocolitis and autoinflammation. *Nat Genet*. 2014 Oct;46(10):1135-9.

Salcedo R, Worschech A, Cardone M, Jones Y, Gyulai Z, Dai RM, Wang E, Ma W, Haines D, O’Huin C, et al. MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J Exp Med*. 2010;207:1625–1636.

Sandrin-Garcia, P. et al. Shared and unique gene expression in systemic lupus erythematosus depending on disease activity. *Ann N Y Acad Sci*, v.1173, p.493-500, 2009.

Sasidharan, P.K., Bindya, M., Sajeeth K.K.G. Hematological Manifestations of SLE at Initial Presentation: Is It Underestimated? *ISRN Hematol.*, 2012.

Sato, E.I. et al. Consenso Brasileiro para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico (LES). *Rev Bras Reumatol*, v.42, n.6, 2002, p. 362-69.

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; 140(6):821–832.

Seitz H, Matsushima G (2010) Dendritic Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *Int Rev Immunol* 29:184-209.

Sestak AL, Nath SK, Sawalha AH, Harley JB (2007) Current status of lupus genetics. *Arthritis Res Ther* 9: 1–9

Shaw PJ, McDermott MF, Kanneganti TD. Inflammasomes and autoimmunity. *Trends Mol Med* 2011;17(2):57–64.

Siggs OM, Miosge LA, Yates AL, Kucharska EM, Sheahan D, Brdicka T, Weiss A, Liston A, Goodnow CC (2007) Opposing functions of the T cell receptor kinase ZAP-70 in immunity and tolerance differentially titrate in response to nucleotide substitutions. *Immunity* 27:912–926.

Sigurdsson S, Göring HH, Kristjansdottir G, Milani L, Nordmark G, Sandling JK, Eloranta ML, Feng D, Sangster-Guity N, Gunnarsson I, Svenungsson E, Sturfelt G, Jönsen A, Truedsson L, Barnes BJ, Alm G, Rönnblom L, Syvänen AC (2008) Comprehensive evaluation of the genetic variants of interferon regulatory factor 5 (IRF5) reveals a novel 5 bp length polymorphism as strong risk factor for systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 17:872–881.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. Lúpus eritematoso sistêmico: acometimento cutâneo/articular. *Rev. Assoc. Med. Bras.* [online]. 2006, vol.52, n.6 [cited 2015-01-05], pp. 384-386.

Taha Khalaf A, Song JQ, Gao TT, Yu XP, Lei TC (2011) CTLA-4 gene polymorphism and the risk of systemic lupus erythematosus in the Chinese population. *J Biomed Biotechnol* 2011: 1-6.

Takagi H, Kanai T, Okazawa A, Kishi Y, Sato T, Takaishi H, Inoue N, Ogata H, Iwao Y, Hoshino K, et al. Contrasting action of IL-12 and IL-18 in the development of dextran sodium sulphate colitis in mice. *Scand J Gastroenterol*. 2003;38:837–844.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):805-20.

Tamura K, Fukuda Y, Sashio H, Takeda N, Bamba H, Kosaka T, Fukui S, Sawada K, Tamura K, Satomi M, Yamada T, Yamamura T, Yamamoto Y, Furuyama J, Okamura H, Shimoyama T. IL18 polymorphism is associated with an increased risk of Crohn's disease. *J Gastroenterol*. 2002 Nov;37 Suppl 14:111-6.

Taylor KE, Remmers EF, Lee AT, Ortmann WA, Plenge RM, Tian C, Chung SA, Nititham J, Hom G, Kao AH, Demirci FY, Kamboh MI, Petri M, Manzi S, Kastner DL, Seldin MF, Gregersen PK, Behrens TW, Criswell LA (2008) Specificity of the STAT4 genetic association for severe disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet* 4:1-9.

Teft WA, Kirchhof, MG, Madrenas, J (2006) A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol* 24:65-97.

Tiffin N, Adeyemo A, Okpechi I. A diverse array of genetic factors contribute to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Orphanet J Rare Dis*. 2013 Jan 7;8:2.

Tobón, G.J. et al. Are autoimmune diseases predictable? *Autoimmun Rev.*, n.4, v.11, p.259-266, 2012.

Tsao BP (2003) The genetics of human systemic lupus erythematosus. *Trends Immunol* 24:595-602.

Tsao BP, Grossman JM. Genetics and systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep*. 2001 Jun;3(3):183-90.

Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine* 2011 Dec 1;365(22):2110–21.

Ulker M, Yazisiz V, Sallakci N, Avci AB, Sanlioglu S, Yegin O, Terzioglu E (2009) CTLA-4 gene polymorphism of exon 1(+49 A/G) in Turkish systemic lupus erythematosus patients. *Int J Immunogenet* 36:245-50.

Uva, L et al. Cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis.*, 2012.

Vilar PM, Sato E. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus*. 2002 Aug;11(8):528–32.

Villani AC, Lemire M, Fortin G, Louis E, Silverberg MS, Collette C, Baba N, Libioulle C, Belaiche J, Bitton A, Gaudet D, Cohen A, Langelier D, Fortin PR, Wither JE, Sarfati M, Rutgeerts P, Rioux JD, Vermeire S, Hudson TJ, Franchimont D. Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet*. 2009 Jan;41(1):71-6

von Hebra F. Jarhesbericht über die Fortschritte der gesammten Medicin in allen Ländern im Jahre 1845. Erlangen: F. Enke. 1845.

Vyse TJ, Kotzin BL. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Ann Rev Immunol*. 1998; 16: 261-92.

Yang et al (2007). Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans. *Am J Hum Genet*. 2007 Jun;80(6):1037-54.

Yokoyama K, Su Ih IH, Tezuka T, Yasuda T, Mikoshiba K, Tarakhovsky A, Yamamoto T (2002) BANK regulates BCR-induced calcium mobilization by promoting tyrosine phosphorylation of IP(3) receptor. *EMBO J* 21: 83–92.

Yurasov S, Tiller T, Tsuiji M, Velinzon K, Pascual V, Wardemann H, Nussenzweig CM (2006) Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission 203: 2255–2261.

Zenewicz LA, Abraham C, Flavell RA, Cho JH (2010) Unraveling the genetics of autoimmunity. *Cell* 140: 791–7. 4: 146-51.

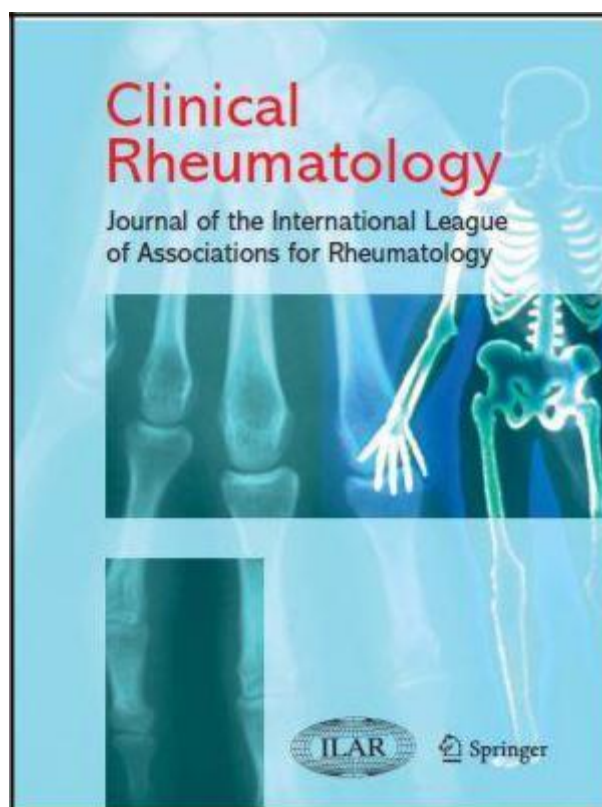
Zurawek M, Fichna M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Gryczyńska M, Fichna P, Nowak J. A coding variant in NLRP1 is associated with autoimmune Addison's disease. *Hum Immunol*. 2010 May;71(5):530-4.

6. Capítulo I - 3'UTR *NLRP3* polymorphism is associated to lupus nephritis

Manuscrito submetido à revista Lupus

Clinical Rheumatology

Fator de impacto 1.74



***3'UTR NLRP3* polymorphism is associated to lupus nephritis**

Heidi L.A. da Cruz¹, Jaqueline A. Silva¹, Catarina J.C. Addobbati^{1,2}, Thiago S. Fragoso³, Alexandre D. Barbosa⁴, Andréa T. Dantas⁴, Angela L.B.P. Duarte⁴, Alessandra Pontillo⁵, Sergio Crovella^{1,2} and Paula Sandrin-Garcia^{1,2}

¹ Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Brazil

² Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Brazil

³ Rheumatology Service, “Hospital das Clínicas”, Federal University of Alagoas, Brazil

⁴ Rheumatology Division, “Hospital das Clínicas”, Federal University of Pernambuco, Brazil

⁵ Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil

Corresponding author:

Heidi LA da Cruz, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Professor Moraes Rego Avenue, s/n, CEP 50.670-420, Recife, Pernambuco, Brazil. Telephone: +55 81 2126-7825.

Email: heidi.alves@gmail.com

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease with a broad range of clinical manifestations. Its etiology is unknown, but there are striking proofs about the involvement of genetic factors. Recent findings provide evidence about the critical role of a molecular complex, known as inflammasome, in the predisposition to SLE and other autoimmune diseases. In this study, rs10754558 and rs35829419 *NLRP3* single nucleotide polymorphisms (SNPs) were analyzed in a genetic association study in a Brazilian population. *NLRP3* expression profile was also evaluated in peripheral blood and peripheral blood derived-

monocytes from SLE patients and healthy controls (HC). *NLRP3* rs10754558 SNP was more frequent in HC than in SLE patients, suggesting that this variant confers a less susceptibility to SLE development itself as well as lupus nephritis, an important cause of morbidity and mortality in SLE individuals. Finally, *NLRP3* relative expression was about 2.0-fold augmented in peripheral blood as well as in monocytes of SLE patients compared to HC. In conclusion, our results indicate that *NLRP3* rs10754558 is associated to less susceptibility towards SLE development and especially towards lupus nephritis development in this cohort. In contrast with previous findings, *NLRP3* expression appeared to be augmented in SLE peripheral blood leukocytes compared to HC.

Keywords

Systemic lupus erythematosus, polymorphism, *NLRP3* inflammasome, lupus nephritis, mRNA

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) (OMIM #152700) is an autoimmune syndrome characterized by the formation of autoantibodies to nuclear components, immune complex deposition, and inflammatory-cell-mediated organ damage [1]. Additionally, SLE is associated with a diverse array of clinical manifestations, with periods of exacerbation and remission related to individual variations, therapeutic management, and other unknown factors [2].

There is a consensus that the innate immunity and inflammatory response plays an important role in SLE pathogenesis. In the last few years, the innate immune signaling complex, inflammasome, has garnered support for a role in promoting organ damage and

contributing to the SLE triggering and maintenance [3]. An important gene of inflammasome complex, *NLRP3* (NLR family, pyrin domain containing 3), belongs to a family of genes called NLR (nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing family) [4]. This group of genes encodes proteins that control the activity of inflammatory caspase-1 by forming the immune complexes called inflammasome [5]. Located in the cytosol, the NLR family acts as an intracellular non-specific recognition of microbial components, endogenous stress and damage signals [6]. After activation, *NLRP3* recruits apoptosis-associated speck-like protein containing a card (ASC) and procaspase-1, leading to autocatalytic processing and activation of caspase-1. Active caspase-1 catalyzes cleavage of the procytokines IL-1 β and IL-18, both proinflammatory cytokines involved in the host response to infection and injury [7].

Gain-of-function mutations in *NLRP3*, leading to a constitutive release of IL-1 β , cause cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS) [8]. Moreover, several autoimmune and autoinflammatory disorders have been associated with *NLRP3* gain-of-function polymorphism [9,10], suggesting that an altered *NLRP3*-inflammasome activation might play a role in the pathogenesis of these complex disorders [7], such as psoriasis [11], rheumatoid arthritis [12], type 1 diabetes [13], Crohn's disease [14] and celiac disease [15].

In a previous study, our group has shown that another inflammasome receptor gene, *NLRP1*, contributes to SLE susceptibility in a Southeast Brazilian population, and in particular with the development of nephritis, rash and arthritis [16]. However, considering recent and novel findings about *NLRP3*-inflammasome in SLE pathogenesis [3, 17-20], we replicated inflammasome polymorphisms association study in a novel cohort of SLE patients from Northeast of Brazil, focusing on *NLRP3* well known functional single nucleotide polymorphisms (SNPs). Furthermore, we investigated *NLRP3* relative expression in peripheral blood and peripheral blood derived-monocytes from SLE patients and healthy controls (HC) to corroborate recently published data [20].

Materials and Methods

NLRP3 genotyping study

Subjects

132 SLE patients (129 women/3 men, mean age 37.1 years $\pm$ 10.5) were recruited at the “Hospital das Clínicas” of Federal University of Pernambuco (HC-UFPE) located at metropolitan area of Recife, Pernambuco, Brazil, between September 2011 and February 2013. All of the enrolled patients meet the criteria of the American College of Rheumatology (ACR) [21] and SLE activity was assessed by the SLE Disease Activity Index (SLEDAI) score [22]. As a control group, we enrolled 154 individuals (125 women / 29 men, mean age 33.5 years $\pm$ 13.4) composed of healthy volunteers without SLE or any other autoimmune diseases, or other problems that may impair the immune system. Subjects with diabetes mellitus, renal or hepatic dysfunction, acute or chronic inflammatory disease, cancer and infection diseases were excluded from the study in order to avoid interference factors in immunity. Subjects were chosen randomly in the population, sex-, age- and race-matched and from the same geographical area of the patients (metropolitan Recife, PE). The clinical, epidemiological and laboratory profile of the research group is in Table 1.

SLE patients and HC were admixed northeastern Brazilians. As self-reported skin color classification is a poor marker for ethnicity, we could evaluate previously the ethnicity of HC using ancestry markers as reported by Kosoy et al. [23] and the ethnic background results demonstrated frequencies of approximately 60% Caucasian, 23% African and 17% Amerindian backgrounds [24].

This study was performed with the approval of the Human Ethics Committee of UFPE (CAAE 03065312.3.0000.5208). Written and informed consent was obtained from all of the

enrolled subjects. Patients underwent a standardized clinical-epidemiological questionnaire besides collection from clinical records. Clinical and epidemiological data were stored and subsequently processed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS – version 10.0 for Windows).

Samples and DNA isolation

From each subject 4.0 mL of whole blood were collected by venipuncture using tubes with EDTA (Vacutainer®, and Becton Dickson, England). Genomic DNA was extracted from whole blood using DNA Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI), according to manufacturer instructions.

SNPs selection and NLRP3 genotyping

Two well-known functional polymorphisms in *NLRP3* were selected due to previously reported association with immune dysregulation: rs35829419 (Q705K) is a non-synonymous coding SNP leading to a substitution at position 705 and an augmented IL-1 β secretion in human monocytes [25]; rs10754558 is a 3'UTR variant previously associated to *NLRP3* mRNA stability [26].

Rs10754558 C>G and rs35829419 C>A were genotyped by using TaqMan assays (Applied Biosystems, Life Technologies, USA). The reactions were prepared based on the manufacturer's protocol and genotyping was performed using ABI7500 Real-Time instrument (Applied Biosystems, Life Technologies, USA). Allelic discrimination was executed as suggested by the manufacturer using SDS software v2.3 (Applied Biosystems, Life Technologies, USA).

Statistical analysis

Chi-square test was used to verify the Hardy–Weinberg equilibrium and the Fisher’s exact test was performed for pair-wise comparison of allele, genotype and haplotype frequencies using contingency tables as appropriate. Patients were also stratified by the presence of clinical manifestations (rash, photosensitivity, arthritis, nephritis, immunological, neurological and hematological alterations). Genotype and allele frequencies were calculated using the Genotype Transposer software. All the statistical analyses were carried out using the open-source R package (www.r-project.org). Haploview software was used to calculate linkage disequilibrium between these polymorphisms and to derive haplotypes. A formal Bonferroni correction for the number of analyzed SNPs would require a significance threshold of $p = 0.025$ (p_0/N_1 , $p_0 = 0.05$, $N_1 = 2$ SNPs). The post-hoc statistical power analysis was performed with the “G*power” software (version 3.0.5), with an alpha-error probability of 0.01.

NLRP3 gene expression assays

Subjects

Relative *NLRP3* gene expression was assessed in whole peripheral blood and peripheral blood-derived monocytes of 10 subjects within the case/control study (10 SLE patients and 10 healthy individuals). SLE patients did not receive systemic treatment, especially corticosteroids drugs or other immunosuppressant before blood collection and healthy individual did not present recent illness or treatment before blood collection. SLE and healthy subjects were sex-, age- and race-matched.

Isolation of peripheral blood monocytes.

Monocytes were isolated by adherence from peripheral blood monocytes obtained by centrifugation over Ficoll-Paque gradient and cultured overnight at 5×10^6 cell in RPMI 1640 with 10% FBS.

Total RNA isolation and Gene expression analysis

Total RNA was isolated from whole blood and monocytes using Qiagen Whole Blood RNase kit or RNAqueous micro kit (Ambion, Life Technologies) respectively, and retrotranscribed with the SuperScript-II kit (Invitrogen). *NLRP3* gene was amplified with specific TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) using the ABI 7500 SDS platform (Applied Biosystems, Life Technologies, USA). Relative quantitative expression between SLE patients and controls cells was calculated as Fold Change (FC), following the indications by Schmittgen and Livak [27]. *GAPDH* was the housekeeping gene used for normalization. Each sample was examined in biological duplicate and technical triplicates for both *NLRP3* and *GAPDH*. T test was done to assess statistically significant difference in gene expression.

Results

Association between *NLRP3* SNPs and SLE

Rs35829419 and rs10754558 SNPs in *NLRP3* were in Hardy–Weinberg equilibrium for both groups SLE patients and controls.

Rs10754558 minor G allele was significantly more frequent in healthy controls (40%) than in SLE patients (31%), and associated with a less susceptibility to SLE development ($p = 0.023$, OR = 0.669, 95% CI 0.46 – 0.95). Also the rs10754558 G/G genotype was more frequent in HC than in SLE patients (19% vs. 9%, $p=0.011$, OR=0.369, 95%CI 0.15 – 0.84) (Table 2).

No statistically significant differences were found in *NLRP3* rs35829419 for allele and genotypes frequencies between cases and healthy controls ($p \geq 0.05$).

When assessing haplotype formation, our results showed the SNPs rs10754558 and rs35829419 were in linkage disequilibrium ($D' = 0.86$) and formed 3 haplotypes. The haplotype containing rs35829419 major C allele and rs10754558 minor G allele (C-G) was more frequent in HC (37.7%) than in SLE patients (29.9%) however, not in a statistical way after Bonferroni correction (OR=1.46, $p=0.044$), as shown in Table 3.

Frequency distribution of *NLRP3* polymorphisms was also analyzed in SLE patients stratified for clinical manifestations (nephritis, arthritis, malar rash, photosensitivity, hematological and neurological alterations). Rs10754558 minor G allele (OR=0.392, $p=0.001$) as well as the G/C (OR=0.287, $p=0.001$) and G/G genotypes (OR=0.217, $p=0.04$) were associated to lupus nephritis, a marker of disease severity and organ damage, showing less susceptibility to the development of this clinical manifestation in the patients who carry this allele and/or genotype (Table 4). No association was found for rs10754558 and other clinical presentation. Rs35829419 did not associate to clinical manifestations ($p \geq 0.05$). The haplotype (C-G) was more frequent in health controls (36,5%) than in patients with nephritis (20,6%) (OR=0.387, $p=0.012$), as shown in Table 5.

NLRP3 relative expression in SLE

We investigated whether the *NLRP3* relative mRNA expression differs between total RNA from peripheral blood and peripheral blood derived-monocytes in SLE patients compared to HC. As shown in Figure 1, we observed that *NLRP3* was 2-fold upregulated in whole blood ($p=0.03$) and 2.24-fold in monocytes ($p=0.07$) compared to HC.

As rs10754558 SNP had been shown to be associated to augmented mRNA stability [26], we analyzed *NLRP3* expression in individuals stratified according to rs10754558 genotypes. *NLRP3* relative expression showed a tendency to be higher in the G/G genotype (1.38-fold) than in the G/C (1.13-fold) and C/C (0.72-fold), however there was no statically difference between the genotypes ($p \geq 0.05$).

Discussion

Genetic factors can modify the extent or severity of disease in susceptible individuals, being involved in SLE's development and innate immune activation through *NLRP3* inflammasome sensing might be one of the immunologic mechanisms in disease's triggering and maintenance [3]. Our study identified associations between *NLRP3* rs10754558 polymorphism and SLE in a Northeast Brazilian population. We found that the polymorphism was associated with less susceptibility toward SLE development and the association was more evident in SLE patients with nephritis. This issue represents the first clinical manifestation in SLE, develops in more than half of patients and remains the leading cause of death [28].

The *NLRP3* inflammasome has received a significant attention as a contributor to lupus nephritis in murine models. Daily treatment of NZB/NZW F1 and MRL/lpr mice with TDZD-8, a selective inhibitor of GSK3 β , reported to activate the *NLRP3*/IL-1 β pathway, reduced renal inflammation, anti-dsDNA antibody production and circulating pro-

inflammatory cytokines, showing that a downregulation of NLRP3 inflammasome was protective against lupus nephritis development in these mice [17]. Moreover, the inhibition of *NLRP3* expression by the use of inhibitors of NF- κ B was able to protect MRL/lpr mice from nephritis and demonstrated a 50% reduction in anti-dsDNA titers [29].

Studies concerning specific polymorphisms in inflammasome-related gene and its relation with SLE susceptibility are scarce, demonstrating the necessity of investigations to better understand the involvement of these molecules in SLE pathology. Our group analyzed the same *NLRP3* polymorphisms in another Brazilian population, but the variants were not associated to SLE [16]. Besides that, in the same work, the authors found an association between *NLRP1* polymorphisms with the development of SLE and lupus nephritis. This difference cannot be attributed to bias due to the ethnicity of our population once Pontillo et al. [13] reported similar allelic and haplotypic frequencies between Recife (Northeastern of Brazil) and São Paulo (Southeast of Brazil). We must consider that SLE is a multifactorial and heterogeneous disease and its susceptibility depends not only upon host genetic aspects, but also on interactions with environmental factors. Additionally, being aware of our limited small sample overall and even more after stratification, we performed a Power analysis to assure that our population size were enough to avoid statistical type I or II error (Power = 0.98). Nevertheless, most of the significant p-values presented in our study are within the statistically significant threshold, even after application of Bonferroni correction.

The *NLRP3* rs10754558 G polymorphism was recently associated to a higher mRNA stability by Hitomi et al. [26]. In our study we identified that the SNP rs10754558 G allele and G/G genotype, were related to an increased quantity of *NLRP3* mRNA (1.38-fold) when compared to the C allele and C/C genotype. Importantly, even though our results agree with the ones found by Hitomi et al [26], they were not statistically significant. Interestingly, in our study group the overall mRNA levels in SLE patients were upregulated in comparison to HC (p=0.03). Our data are in contrast to Yang et al. [20] findings. They analyzed *NLRP3*

expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with SLE and healthy controls in a Chinese population. Their data showed a significant downregulation of NLRP3 inflammasome in SLE patients, and a significant negative correlation between the inflammasome expression and disease progression, which indicated a possible involvement of deregulation of this inflammasome platform in the pathogenesis of SLE. This contradictory result may be resulted due a number of environmental factors involved in SLE pathogenesis.

In a recent study, Muller-Calleja et al. [31] showed that patients with the antiphospholipid syndrome (APS), an autoimmune disorder particularly associated with SLE, presented increased expression of *NLRP3* while patients with lupus without antiphospholipid antibodies (aPL) had similar expression of *NLRP3* as healthy controls. The authors provided evidence that human aPL are able to induce directly inflammasome activity in the absence of TLR2 and TLR4, resulting in the secretion of large amounts of IL-1 β by monocytes in patients with APS. However, in our group of study for mRNA levels, none of the assessed SLE patients presented APS, what can lead us to infer that the *NLRP3* expression in our results were not influenced by this syndrome and that others SNPs in the regulatory region of this gene might be influencing in the *NLRP3* expression.

As known, in SLE patients, there are increased serum antinuclear and anti-glomerular autoantibodies, leading to an enhanced autoimmune repertoire [2]. We hypothesized that immune complexes, formed secondary to antibody recognition of organ-specific antigens, causes cell death and organ failure, exposing damage-associated molecular pattern (DAMPs) and stimulating inflammasome activation. These DAMPs not only activate caspase-1 through the NLRP3 inflammasome, but may also stimulate membrane-bound pattern recognition receptors, such as the Toll-like receptors (TLRs). Signaling of this pathway leads to the activation of transcription factor, nuclear factor-kB (NF-kB), resulting in increased transcription of pro-IL-1 β , pro-IL-18 and NLRP3 [32], as seen in our results for this last one.

In conclusion, our results showed *NLRP3* as associated to SLE and conferring less susceptibility to nephritis in our population. *NLRP3* expression was augmented in SLE patients leading to higher IL-1 β production, which induces considerable damage when control of its processing and release is compromised. Further research and confirmation by other studies as well as in different populations are needed to understand the pathophysiology of the disease.

Acknowledgments and Funding

We would like to thank patients and control individuals for their participation. This work was supported by the following Brazilian funding agencies: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco).

Conflict of interest statement

There are no conflicts of interest.

References

1. Mok CC, Lau CS (2003) Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 56:481–490.
2. Tiffin N, Adeyemo A, Okpechi I (2013) A diverse array of genetic factors contribute to the pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:2

3. Kahlenberg JM, Kaplan MJ (2014) The inflammasome and lupus: another innate immune mechanism contributing to disease pathogenesis? *Curr Opin Rheumatol* 26(5):475-81.
4. Tan MS, Yu JT, Jiang T et al (2013) NLRP3 polymorphisms are associated with late-onset Alzheimer's disease in Han Chinese. *J Neuroimmunol* 265(1-2):91-5.
5. Ting JPY, Willingham SB, Bergstralh DT (2008) NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol* 8:372-9.
6. Martinon F (2007) Orchestration of pathogen recognition by inflammasome diversity: variations on a common theme. *Eur. J. Immunol* 37:3003–3006.
7. Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M et al (2006) Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 24:317-27.
8. Aksentijevich I, Putnam DC, Remmers EF et al (2007) The clinical continuum of cryopyrinopathies: novel CIAS1 mutations in North American patients and a new cryopyrin model. *Arthritis Rheum* 56:1273–1285.
9. Shinkai K, McCalmont TH, Leslie KS (2008) Cryopyrin-associated periodic syndromes and autoinflammation. *Clin Exp Dermatol* 33:1–9.
10. Shaw PJ, McDermott MF, Kanneganti TD (2011) Inflammasomes and autoimmunity. *Trends Mol Med.* 17(2): 57–64.

11. Carlstrom M, Ekman AK, Petersson S, Soderkvist P, Enerback C (2012) Genetic support for the role of the NLRP3 inflammasome in psoriasis susceptibility. *Exp. Dermatol.* 21: 932– 937.

12. Kastbom A, Verma D, Eriksson P, Skogh T, Wingren G, Söderkvist P (2008) Genetic variation in proteins of the cryopyrin inflammasome influences susceptibility and severity of rheumatoid arthritis (The Swedish TIRA project). *Rheumatology* 47(4):415-417.

13. Pontillo A, Brandao L, Guimaraes R, Segat L, Araujo J, Crovella, S (2010) Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil. *Autoimmunity* 43, 583–589.

14. Villani AC, Lemire M, Fortin G et al (2009) Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet.* 41(1):71-6.

15. Pontillo A, Vendramin A, Catamo E, Fabris A, Crovella S (2011) Themissense variation Q705K in CIAS1/NALP3/NLRP3 gene and an NLRP1 haplotype are associated with celiac disease. *Am. J. Gastroenterol* 106: 539–544.

16. Pontillo A, Girardelli M, Kamada AJ, Pancotto JA, Donadi EA, Crovella S, Sandrin-Garcia P (2012) Polimorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 45(4):271-8.

17. Zhao J, Wang H, Huang Y et al (2014) Lupus nephritis: Glycogen synthase kinase 3 β promotes renal damage through activation of NLRP3 inflammasome in lupus-prone mice. *Arthritis Rheumatol.* doi: 10.1002/art.38993. [Epub ahead of print].

18. Yang CA, Huang ST, Chiang BL (2014) Sex-dependent differential activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in SLE macrophages. *Rheumatology* [Epub ahead of print].

19. Lech M, Lorenz G, Kulkarni OP et al (2014) NLRP3 and ASC suppress lupus-like autoimmunity by driving the immunosuppressive effects of TGF- β receptor signalling. *Ann Rheum Dis*. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205496. [Epub ahead of print].

20. Yang Q, Yu C, Yang Z et al (2014) Deregulated NLRP3 and NLRP1 inflammasomes and their correlations with disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 41(3):444-52.

21. Hochberg MC (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 40(9):1725.

22. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH (1992) Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 35:630-40.

23. Kosoy R, Nassir R, Tian C et al (2009) Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America. *Hum Mutat* 30: 69-78.

24. Coelho AV, Moura R, Addobbati C et al. A rapid screening of ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco, Brazil. *Genet Mol Res* (in press)

25. Verma D, Sarndahl E, Andersson H et al (2012) The Q705K polymorphism in NLRP3 is a gain-of-function alteration leading to excessive interleukin-1 β and IL-18 production. *Plos One*. 7:e34977.

26. Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M et al (2009) Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 124: 779–785.

27. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta DeltaC(T))} Method. *Methods*. 25(4):402-8.

28. Appel GB, Radhakrishnan J, D’Agati V (2007) Secondary glomerular disease. In: *The Kidney*, edited by Brenner BM, 8th Ed., Philadelphia, PA, Saunders, 2007, pp 1067–1146.

29. Zhao J, Zhang H, Huang Y, et al (2013) Bay11-7082 attenuates murine lupus nephritis via inhibiting NLRP3 inflammasome and NF-kB activation. *Int Immunopharmacol* 17:116–122.

30. Gram AM, Frenkel J, Ressing ME (2012) Inflammasomes and viruses: cellular defence versus viral offence. *J Gen Virol* 93: 2063-2075.

31. Müller-Calleja N, Köhler A, Siebald B, et al (2015) Cofactor-independent antiphospholipid antibodies activate the NLRP3-inflammasome via endosomal NADPH-oxidase: implications for the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost.* 15;113(4).

32. Wen H, Miao EA, Ting JP-Y (2013) Mechanisms of NOD-like receptor-associated inflammasome activation. *Immunity*. 39:432–441.

Table 1. Distribution of clinical, epidemiological and laboratory characteristics among SLE cases and controls.

Variable	Cases n=132 (%)	Controls n=154 (%)	p-value
Sex			
Male	3 (2)	29 (19)	<0.001 ^a
Female	129 (98)	125 (81)	
Mean Age	37,1 (±10,5)	33,5 (±13,4)	
Clinical Manifestations			
Cutaneous	89 (64%)		
Photosensitivity	85 (61%)		
Lupus arthritis	88 (63%)		
Ulcer	29 (20%)		
Hematologic	82 (59%)		
Nephritis	58 (42%)		
Neurological	12 (8%)		
FAN (Antinuclear Factor)	114 (82%)		
Immunologic	44 (32%)		
Anti-DNA	37 (27%)		

^a
t-test

Table 2. Genotype and allelic frequencies of *NLRP3* SNP polymorphisms in SLE patients and control subjects.

Variant	Cases n=132 (%)	Controls n=154 (%)	p-value; OR [95%C.I.]		
rs10754558					
Alleles					
C	182 (69)	184 (60)	-	-	-
G	82(31)	124 (40)	0.023	0.669	0.46 – 0.95
Genotypes					
C/C	61(46)	60 (39)	-	-	-
G/C	60(45)	64 (42)	0.702	0.879	0.51 – 1.49
G/G	11 (9)	30 (19)	0.011	0.369	0.15 – 0.84
rs35829419					
Alleles					
C	258 (98)	295 (96)	-	-	-
A	6(2)	13 (4)	0.609	0.731	0.21 – 2.33
Genotypes					
C/C	126 (95)	143 (93)	-	-	-
C/A	6(5)	9 (6)	0.607	0.677	0.19 – 2.12
A/A	0(0)	2 (1)	-	-	-

Table 3. Distribution of *NLRP3* gene haplotypes between SLE patients and healthy controls (HC).

Haplotype	SLE (n=132)	HC (n=154)	p-value	OR	95%IC
<i>NLRP3</i> (D'=86)					
C-C	0.682	0.592	Ref	1	NA
C-G	0.295	0.377	0.044	1.46	1.01 – 2.10
A-G	0.018	0.031	0.29	1.81	0.60 – 5.47

Table 4. Distribution of *NLRP3* gene haplotypes between SLE patients with and without lupus nephritis and healthy controls (HC).

SNP ID (rs)		SLE		HC (n=154)	p-value; OR[95%IC]	
		SLE/NL+ n=58(%)	SLE/NL- n=65(%)		SLE/NL+ vs.SLE/NL-	SLE/NL+ vs. HC
rs10754558						
Allele	C	92 (79)	78 (60)	184 (60)	Ref	Ref
	G	24 (21)	52 (40)	124 (40)	0.001; 0.392 [0.21 – 0.71]	0.0001; 0.387 [0.22 – 0.65]
Genotype						
	C/C	37 (64)	21 (32)	59 (38)	Ref	Ref
	G/C	18 (31)	36 (56)	66 (43)	0.001; 0.287 [0.12 – 0.66]	0.015; 0.436 [0.21 – 0.88]
	G/G	3 (5)	8 (12)	29 (19)	0.04; 0.217 [0.03 – 1.03]	0.002; 0.166 [0.03 – 0.59]

Table 5. *NLRP3* haplotype distribution in SLE patients classified according to the presence of nephritic lupus (NL).

Haplotype	SLE		HC (n=154)	p-value; OR[95%IC]		
	SLE/NL+ n=58(%)	SLE/NL- n=65(%)		SLE/NL+ vs.SLE/NL-	SLE/NL+ vs. HC	
<i>NLRP3</i> (D'=86)						
C-C	0.793	0.588	0.592	Ref	Ref	
C-G	0.206	0.365	0.377	0.04; 0.420 [0.15 – 1.05]	0.012; 0.387 [0.16 – 0.83]	
A-G	0.019	0.034	0.031	0.58; 0.402 [0.01 – 8.02]	0.664; 0.415 [0.01 – 2.87]	

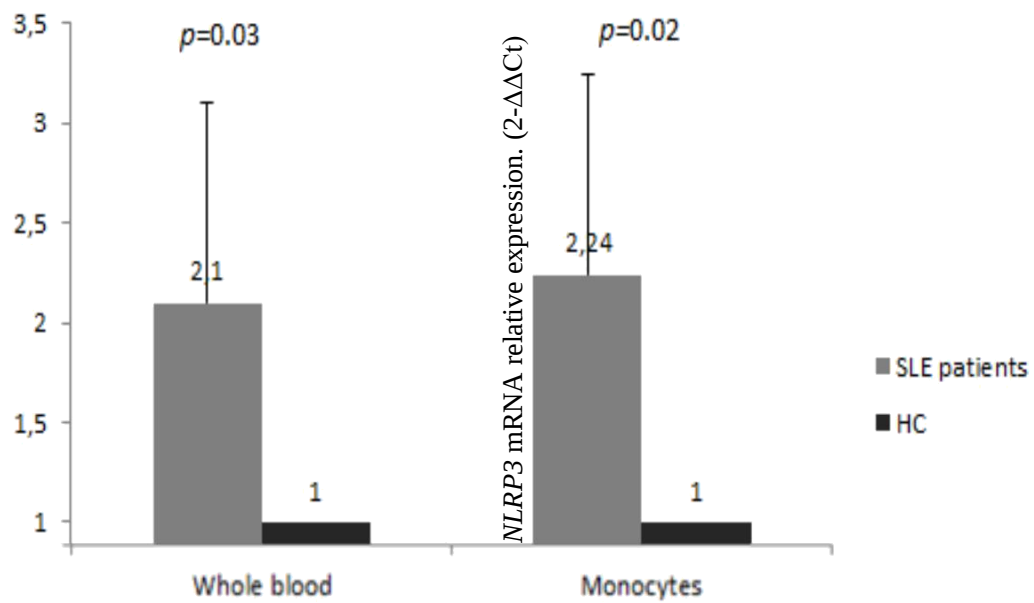


Figure 1. *NLRP3* mRNA expression. Peripheral blood (WB) and monocytes (Mo) obtained from healthy subjects and SLE patients as described in Materials and methods. *NLRP3* mRNA expression is increased in whole blood and monocytes from SLE patients compared with controls.

7. **Capítulo II** - Polymorphisms and Gene Expression Levels of Inflammasome Components in Systemic Lupus Erythematosus

Manuscrito submetido à revista Lupus

Immunobiology

Fator de impacto 3.18



Polymorphisms and Gene Expression Levels of Inflammasome Components in Systemic Lupus Erythematosus

Heidi Lacerda Alves da Cruz¹, Jaqueline de Azêvedo Silva¹, Catarina Addobbati Jordão Cavalcanti^{1,2}, Thiago Sotero Fragoso³, Alexandre Domingues Barbosa⁴, Andréa Tavares Dantas⁴, Henrique de Ataíde Mariz⁴, Angela Luzia Branco Pinto Duarte⁴, Alessandra Pontillo⁵, Sergio Crovella^{1,2} and Paula Sandrin-Garcia^{1,2}

¹ Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil;

² Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil;

³ Rheumatology Service, “Hospital das Clínicas”, Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil;

⁴ Rheumatology Division, “Hospital das Clínicas”, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil;

⁵ Laboratory of Immunogenetics, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil;

Corresponding author:

Heidi Lacerda A. da Cruz

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/nº, CEP 50.670-420 Recife, Pernambuco, Brazil.

Tel. +55 81 2126-7825 e-mail: heidi.alves@gmail.com

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a complex autoimmune disorder displaying heterogeneous clinical manifestations and multiple susceptibility genes. Recent findings provide evidence about the critical role of inflammasomes in the predisposition to autoimmune diseases. Genetics variants within inflammasome-related genes and differential expression of their components have been associated with various inflammatory diseases but its relation to SLE remains unknown. In this study, we aimed to investigate the role of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and the expression profile of genes responsible for the inflammatory response and their relations to the development and severity of the disease. Were analyzed ten variants in 7 genes (*NLRP1*, *NLRP4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL-18* and *IL1B*) in 132 SLE patients and 154 healthy controls using Taqman fluorogenic probes. We

also evaluated the mRNA relative expression of these genes in peripheral blood derived-monocytes in a resting condition and after LPS+ATP stimulation of patients and healthy controls. Finally, we conducted an ELISA assay to evaluate the IL-1 β secretion in SLE patients and controls. No significant differences were observed in the allelic or genotypes frequencies when SLE patients were compared with controls ($p \geq 0.05$). When inflammasome SNPs were analyzed as predictors of SLE clinical manifestations we observed that *IL-18* gene was associated with increased risk to the development of malar rash (OR=4.65, $p=9.49\text{e-}05$), whereas the *IL-1B* gene was associated to less susceptibility to photosensitivity (OR=0.50, $p=0.021$). In relation to mRNA expression in peripheral blood derived-monocytes, *NLRP1*, *NLRC4*, *CASP1* and *IL1B* genes were upregulated in SLE patients in comparison to healthy controls, even after LPS+ATP stimulation. In conclusion, our results indicate that different inflammasomes components appear altered in the disease, resulting in enhanced activation and subsequently IL-1 β production, suggesting that the inflammasomes play a crucial role in SLE pathogenesis. These data indicate the importance of the identification of other genetic risk factors that may be involved in susceptibility to inflammatory diseases in order to investigate further the etiology and molecular pathways responsible for autoimmune diseases.

Keywords: systemic lupus erythematosus, polymorphisms, inflammasome, *IL-18*, *IL1B*, mRNA.

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) (OMIM 152700) is a complex, prototypic autoimmune disease that predominantly affects women of child-bearing age. The hallmark of SLE is the generation of autoantibodies that react with self-nuclear and cytoplasmic antigens, culminating in immunologic attacks to body organs, cell death and organ failure¹⁻³. Although under intense investigations, the genetic basis of human SLE is still not well understood⁴⁻⁶.

Several studies indicate that abnormal activation of genes related to the inflammatory response, resulting in an altered activation of IL-1 β and/or NF- κ B, may contribute to the pathogenesis of autoimmune disorders with a strong inflammatory component, as observed in

SLE⁹⁻¹³. In the last few years, the innate immune signaling complex, called inflammasome, has garnered support for a role in promoting organ damage and contributing to the SLE triggering and maintenance⁷. Different cytoplasmic innate immune receptors, belonging to Nod-like Receptors/NLRs (i.e.: NLRP1, NLRP3, NLRC4) or PYHIN (AIM2, IFI16) families, have been described to be able to assemble an inflammasome in response to pathogen- or danger-associated molecular patterns (PAMPs or DAMPs) leading to caspase-1 activation and consequent cleavage and secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18⁸. Genetic variants in inflammasome genes have been associated to dysregulated IL-1 β and/or IL-18 production and to rare autoinflammatory syndromes as well as to multifactorial disorders, such as autoimmune diseases (i.e.: Type-1 diabetes, vitiligo, celiac disease, Crohn's disease).

In a previous study, our group has shown that polymorphisms in the inflammasome receptor gene *NLRP1* were associated to SLE in a Southeast Brazilian population, and in particular with the development of specific SLE clinical presentations such as nephritis, rash and arthritis¹⁴. Even though, the role of inflammasome in the pathogenesis of SLE remains unclear.

Kahlenberg and Kaplan⁷ have recently reviewed novel findings about the importance of inflammasome in SLE organ damage and in the link between environment and development of the disease, emphasizing the involvement of this complex in the immunologic dysfunction leading to SLE¹⁵⁻¹⁷.

To deeper understanding the effect of inflammasome genetics in SLE development, we analyzed the frequencies distribution of inflammasome SNPs and inflammasome genes expression in a novel cohort of SLE patients from Northeast of Brazil.

Materials and Methods

Inflammasome genotyping study

Subjects

For this study, 132 SLE patients (129 women/3 men, mean age 37.1 years $\pm$ 10.5) and 154 healthy individuals (125 women / 29 men, mean age 33.5 years $\pm$ 13.4) were recruited at the “Hospital das Clínicas” of Federal University of Pernambuco (HC-UFPE), metropolitan area of Recife (Pernambuco, Brazil).

Patients attended the criteria of the American College of Rheumatology (ACR)¹⁸ and SLE activity was assessed by the SLE Disease Activity Index (SLEDAI) score¹⁹. The control group was composed of healthy volunteers without SLE or any other autoimmune diseases, or other problems that may impair the immune system. Subjects with diabetes mellitus, renal or hepatic dysfunction, acute or chronic inflammatory disease, cancer, infection diseases were excluded from the study. Subjects were chosen randomly in the population, sex-, age- and race-matched and from the same geographical area of the patients (metropolitan Recife, PE). The ethnicity of HC was analyzed previously using ancestry markers as reported by Kosoy et al.²⁰ and the ethnic background results demonstrated frequencies of approximately 60% Caucasian, 23% African and 17% Amerindian backgrounds²¹.

A written and informed consent for this study was obtained from all the participants and was approved by the Human Ethics Committee of UFPE (CAAE 03065312.3.0000.5208). Patients underwent a standardized clinical-epidemiological questionnaire besides collection from clinical records. Clinical and epidemiological data were stored and subsequently processed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS – version 10.0 for Windows).

Samples and DNA isolation

Blood was collected in EDTA-stabilized tubes (Vacutainer®, Becton Dickinson, England). Genomic DNA from SLE patients and controls was extracted from peripheral blood by using DNA Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), according to manufacturer instructions.

SNPs selection and inflamassome genotyping

Ten SNPs were selected within seven main inflammasome genes (*NALP1*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL1B* and *IL18*) based on public databases Hapmap (www.hapmap.org) and GeneBrowser (www.genome.ucsc.edu). Rs12150220 (L155H) and rs2670660 (promoter) in *NLRP1* were chosen among other SNPs on previous association studies²².

SNPs were genotyped by using TaqMan assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reactions were prepared based on the manufacturer's protocol and genotyping was performed using ABI7500 Real-Time instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Allelic discrimination was executed as suggested by the manufacturer using SDS software v2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistical analysis

To verify the Hardy–Weinberg equilibrium chi-square test was used and the Fisher's exact test was performed for pair-wise comparison of allele, genotype and haplotype frequencies using contingency tables as appropriate. Patients were also stratified by the presence of clinical manifestations (rash, photosensitivity, arthritis, nephritis, immunological,

neurological and hematological alterations). Genotype and allele frequencies were calculated using the Genotype Transposer software. All the statistical analyses were carried out using the open-source R package (www.r-project.org). Haploview software was used to calculate linkage disequilibrium between these polymorphisms and to derive haplotypes. A formal Bonferroni correction for the number of analyzed SNPs would require a significance threshold of $p = 0.005$ (p_0/N_1 , $p_0 = 0.05$, $N_1 = 10$ SNPs). The post-hoc statistical power analysis was performed with the “G*power” software (version 3.0.5), with an alpha-error probability of 0.01.

Inflammasome gene expression assays

Subjects

We investigated the relative mRNA expression of *IL-1 β* , *NALP1*, *NLRC4*, *AIM2*, *ASC* and *CASP1* genes in peripheral blood-derived monocytes of 10 subjects within the case/control study (10 SLE patients and 10 healthy individuals) and if their expression differs between the basal condition and after LPS+ATP stimulation.

SLE and healthy subjects were sex-, age- and race-matched. Healthy individual did not present recent illness or treatment before blood collection.

Isolation and culture of peripheral blood monocytes

Monocytes were isolated by adherence from peripheral blood mononuclear cells obtained by centrifugation over Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences, USA) gradient and cultured at 0.5×10^6 cells/ml in RPMI-1960 medium with 10% Fetal Bovine Serum (Gibco®, Life Technologies, USA).

Monocytes were stimulated with 1µg/ml lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 4 hours and then treated with 1mM ATP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 15 minutes.

Culture supernatants was harvested and used for IL-1β secretion analysis, and cells were lysed for mRNA isolation and gene expression analysis.

IL-1β measurement

The secreted IL-1β was measured with ELISA (IL-1β assays, R&D systems, USA). Results were expressed in picograms per milliliter. Secretion differences between patients and controls were tested with Mann-Whitney U test with SPSS 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Total RNA isolation and Gene expression analysis

Total RNA was isolated from monocytes using RNAqueous micro kit (Ambion, Life Technologies, USA), following the manufacturer's instructions and retrotranscribed with the SuperScript-II kit (Invitrogen). Inflammasome genes (*NALP1*, *NLRC4*, *AIM2*, *ASC*, *CASP-1* and *IL-1β*) were amplified with specific TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) using the ABI 7500 SDS platform (Applied Biosystems, Life Technologies, USA). *GAPDH* was the housekeeping gene used for normalization. Relative quantitative expression was calculated as Fold Change (FC), following the indications by Schmittgen and Livak²³. T test was done to assess significant difference in gene expression.

Results

Genotyping study

Inflammasome polymorphisms distribution was assessed in 132 individuals with SLE (cases) and 154 healthy subjects (controls). The clinical, epidemiological and laboratory profile of the research group is in Table 1.

Table 1. Distribution of selected characteristics among SLE cases and controls.

Variable	Cases (n=132)	(%)	Controls (n=154)	%
Sex				
Male	3	(2%)	29	(19%)
Female	129	(98%)	125	(81%)
Mean Age	37,1 ($\pm 10,5$)		33,5 ($\pm 13,4$)	
Clinical Manifestations				
Cutaneous	89 (64%)			
Photosensitivity	85 (61%)			
Lupus arthritis	88 (63%)			
Ulcer	29 (20%)			
Hematologic	82 (59%)			
Nephritis	58 (42%)			
Neurological	12 (8%)			
Fan	114 (82%)			
Immunologic	44 (32%)			
Anti-DNA	37 (27%)			

SNPs allelic and genotypic frequencies were in Hardy–Weinberg equilibrium in patients and controls. Minor alleles and genotypes frequencies are reported in table 2.

Table 2. Genotype and allelic frequencies of inflammasome SNP polymorphisms in SLE patients and healthy controls (HC).

Gene	SNP ID	Minor Allele/ Genotype	SLE (n=132)	HC (n=154)	p-value	OR	95%IC
<i>NLRP1</i>	rs2670660	G A/A-A/G-G/G	100 (0.40) 43-62-19	110 (0.41) 47-66-22	0.982 0.985	0.982	0.68 – 1.41
<i>NLRP1</i>	rs12150220	T A/A-A/T-T/T	65 (0.26) 68-47-9	87 (0.30) 75-55-16	0.388 0.607	0.837	0.58 – 1.24
<i>NLRP4</i>	rs455060	G A/A-A/G-G/G	83 (0.33) 58-51-16	111 (0.37) 59-69-21	0.369 0.526	0.837	0.57 – 1.21
<i>AIM2</i>	rs2276405	T C/C-C/T-TT	5 (0.02) 112-5-0	6 (0.02) 117-6-0	1 1	0.873	0.20 – 3.48
<i>AIM2</i>	rs35130877	G T/T-G/T-T/T	0 126-0-0	0 152-0-0	- -	-	-
<i>CARD8</i>	rs2043211	T A/A-A/T-T/T	63 (0.27) 58-51-6	73 (0.24) 84-59-7	0.611 0.681	1.10	0.72 – 1.68
<i>CASP1</i>	rs572687	A G/G-A/G-A/A	42 (0.16) 89-32-5	50 (0.18) 95-44-3	0.818 0.439	1.07	0.66 – 1.72
<i>IL1B</i>	rs114363	T C/C-C/T-T/T	74 (0.29) 60-58-8	86 (0.31) 67-58-14	0.705 0.496	0.928	0.62 – 1.36
<i>IL1B</i>	rs114364	A G/G-A/G-A/A	42 (0.18) 79-28-7	53 (0.20) 87-41-6	0.732 0.555	0.916	0.56 – 1.47
<i>IL18</i>	rs1946519	A C/C-A/C-A/A	93 (0.40) 41-53-20	114 (0.43) 46-60-27	0.648 0.876	0.918	0.63 – 1.33

SNPs of the 3 inflammasome receptors genes, *NLRP1*, *NLRP4* and *AIM2*, were not significantly associated to SLE ($p \geq 0.05$) (Table 2). The *AIM2* rs35130877 variation has not been found in our groups of patients and controls.

The rs2043211 polymorphism in the adaptor molecule *CARD8* was not associated with SLE ($p=0.611$), as well in the effector molecule *CASP1* ($p=0.818$). No statistically significant differences were found in *IL-1B* and *IL18* for allele and genotypes frequencies between cases and healthy controls ($p \geq 0.05$).

No linkage disequilibrium (LD) was found for polymorphisms within the same gene with the exception of rs114363 and rs114364 in *IL-1B* ($D'=100$). The three haplotypes (G-C, T-G, C-A) resulting from Haploview analysis were not differentially distributed between SLE

and HC (Table 3). *NLRP1* haplotypes rs12150220 and rs2670660 were calculated considering their previously reported LD^{24,25} and the D' border-line value (D'=81). As shown in Table 3, the four haplotypes (A-A, T-G, A-G and T-A) were not significantly differently distributed between SLE and HC.

Table 3. Distribution of inflammasome gene haplotypes between SLE patients and HC.

Haplotypes	SLE (n=132)	HC (n=154)	p-value	OR	95%IC
<i>NLRP1</i> (D'=78)					
A-A	0.575	0.546	Ref	1	Ref
T-G	0.238	0.248	0.76	1.07	0.71 – 1.60
A-G	0.163	0.158	0.82	1.06	0.64 – 1.77
T-A	0.023	0.049	0.10	2.63	0.83 – 8.29
<i>IL-1B</i> (D'=100)					
C-G	0.531	0.497	Ref	1	Ref
T-G	0.289	0.309	0.53	1.13	0.77 – 1.66
C-A	0.180	0.194	0.59	1.13	0.73 – 1.74

The presence of different clinical manifestations in SLE may possibly be related to dysfunction of inflammasome as malar rash, photosensitivity, arthritis, nephritis, neurological and hematological abnormalities. We observed the association between some inflammasome genes SNPs and the occurrence of patients' clinical manifestations, resulted in SLE-subgroups/HC comparisons as reported in Tables 4 and 5.

For the *IL18* rs1946519 the genotypes C/A (OR=2.34, $p=0.024$) and A/A (OR=4.65, $p=9.49\text{e-}05$) were more frequent in SLE patients with malar rash in respect of health control, conferring risk to this manifestation (Table 4).

Table 4. Association of polymorphisms of *IL18* gene in SLE patients classified according to the presence of malar rash (SLE-MR).

SNP ID		SLE		HC (n=154)	P-value; OR[95%IC]	
		SLE/MR+ n=89(%)	SLE/MR- n=32 (%)		SLE/MR+ vs.SLE/MR-	SLE/MR+ vs. HC
rs1946519 – IL18						
Allele	C	112 (63)	28 (52)	152 (57)	1	1
	A	66 (37)	26 (48)	114 (43)	0.155; 0.635 [0.32 – 1.23]	0.766; 1.31 [0.34 – 4.64]
Genotype	C/C	13 (15)	6 (22)	46 (35)	1	1
	C/A	40 (45)	14 (52)	60 (45)	0.179; 2.17 [0.68 – 6.86]	0.024; 2.34 [1.07 – 5.36]
	A/A	36 (40)	7 (26)	27 (20)	0.192; 2.33 [0.54 – 9.95]	9.49e-05; 4.65 [2.0 – 11.3]

IL1B rs1143643 minor T allele (OR=0.50, $p=0.021$) as well as the C/T (OR=0.143, $p=0.034$) and T/T (OR=0.205, $p=0.028$) genotypes were associated to photosensitivity, showing less susceptibility to the development of this clinical manifestation in the patients who carry this allele and/or genotype in respect of the patients who do not (Table 5). No association was found for the others SNPs and others clinical presentations ($p \geq 0.05$).

Table 5. Association of polymorphisms of *IL1B* gene in SLE patients classified according to the presence of photosensitivity (SLE-Photo).

SNP ID		SLE		HC (n=154)	P-value; OR[95%IC]	
		SLE/Photo+ n=85(%)	SLE/Photo- n=38 (%)		SLE/Photo+ vs.SLE/Photo-	SLE/Photo+ vs. HC
rs1143643 – <i>IL1B</i>						
Allele	C	130 (76)	47 (62)	192 (69)	1	1
	T	40(24)	29 (38)	86 (31)	0.021; 0.50 [0.26 – 0.93]	0.104; 0.687 [0.43 – 1.08]
Genotype	C/C	47(55)	13 (34)	67 (48)	1	1
	C/T	36(42)	21 (55)	58 (42)	0.102; 0.477 [0.19 – 1.15]	0.678; 0.885 [0.48 – 1.6]
	T/T	2(2)	4 (11)	14 (10)	0.034; 0.143 [0.01 – 1.12]	0.028; 0.205 [0.02 – 0.96]

Inflammasome expression analyses

We investigated the relative mRNA expression of *IL-1 β* , *NALP1*, *NLRC4*, *AIM2*, *ASC* and *CASP1* genes in monocytes of eleven SLE patients and ten healthy controls (HC) and if their expression differs between the basal condition and after LPS+ATP stimulation.

We evaluated the expression in unstimulated and LPS+ATP-stimulated monocytes to analyze its capacity to induce the expression in the studied inflammasome genes and IL-1 β secretion in monocytes supernatants as marker of inflammasome activation. As shown in Figure 1, when we compared the gene expression between non-stimulated SLE monocytes and non-stimulated HC monocytes, *NLRP1*, *NLRC4*, *CASP1* genes were upregulated in SLE patients, specially *IL-1 β* presented a remarkable increment in SLE patients' expression levels (5.45-fold, $p=0.009$) when comparing to HC monocytes. Basal *NLRP1* (3.19-fold, $p=0.037$), *NLRC4* (2.58-fold, $p=0.043$) and *CASP1* (3.87-fold, $p=0.026$) expression levels were also found increased in resting SLE patients monocytes with respect to resting HC monocytes. *AIM2* and *ASC* expression were not statistically different between non-stimulated SLE monocytes and HC non-stimulated monocytes ($p=0.835$ and $p=0.395$, respectively).

When comparing inflammasome components gene expression between LPS+ATP-stimulated SLE monocytes and LPS+ATP-stimulated HC monocytes, we also observed the upregulation of *NLRP1*, *NLRC4*, *CASP1* and *IL-1 β* genes in SLE patients: *NALP1* (8.58-fold, $p=0.005$), *NLRC4* (3.85-fold, $p=0.05$), *CASP1* (6.29-fold, $p=0.003$), *IL-1 β* (36.07-fold, $p=0.002$), as shown in Figure 1. There was no difference observed between expression of *AIM2* and *ASC* after LPS+ATP stimulation ($p=0.189$ and $p=0.118$, respectively).

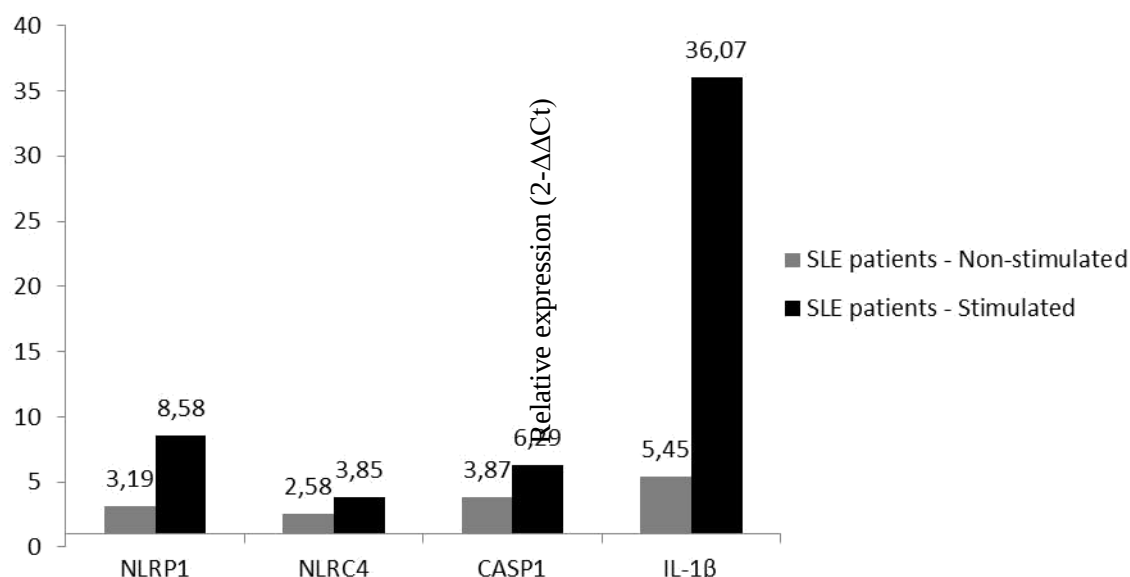


Figure 1. Relative gene expression of inflammasome genes. Among studied genes, we observed an increased upregulation of *NLRP1*, *NLRC4*, *CASP1* and *IL-1 β* genes in SLE patients, in relation to healthy controls, in both conditions: non-stimulated and LPS+ATP stimulation. The expression levels in healthy controls was set at 1 and is not shown in the graphic.

IL-1 β secretion was incremented in patients comparing to HC in unstimulated monocytes (mean=23.14 vs. 1.13 pg/ml) and after LPS (58.76 vs. 1.41pg/ml), LPS+ATP (421.48 vs. 217.2 pg/ml) and only ATP stimulus (62.91 vs. 11.13pg/ml). However, no statistical significance was observed (Figure 2).

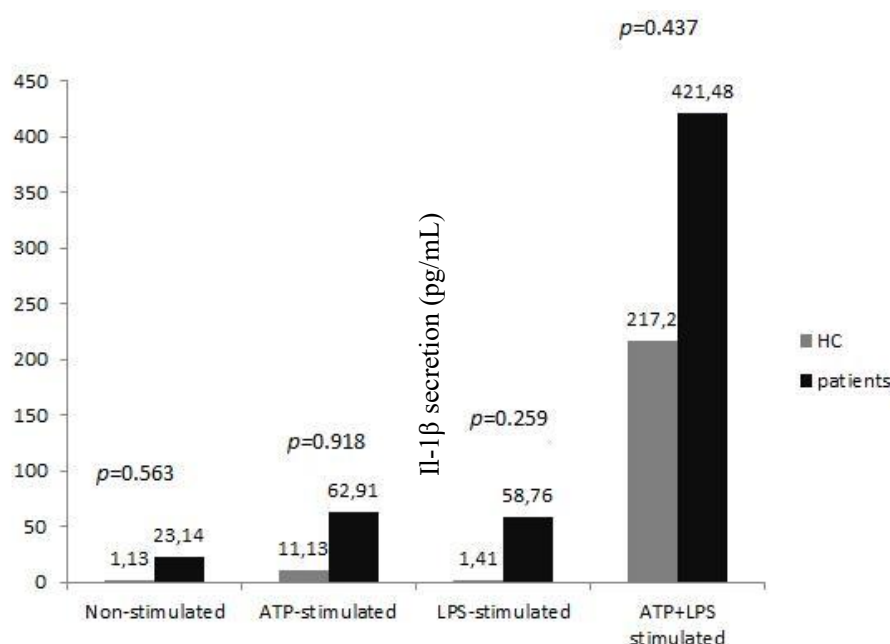


Figure 2. IL-1 β secretion in SLE patients and healthy control (HC) and 4 different treatments (Non-stimulated, ATP-stimulated, LPS-stimulated and ATP+LPS-stimulated) in monocytes culture.

Discussion

Multicellular organisms have evolved an intricate network signals that enable an efficient production of innate and adaptive immune responses to endogenous and exogenous antigens. The problem is when the generated response is changed and triggers exacerbated and chronic inflammation⁷. In this study, we demonstrated the relation between inflammasome SNPs and SLE clinical manifestation as well a chronic expression of some inflammasome components in monocytes of SLE patients.

Although we did not observe a significant difference in the allelic and genotypic frequencies of inflammasome genes between SLE patients and controls, it is still possible that these molecules have an important role in the progression of the disease, as found in clinical manifestations and genetic expression analyzes.

Glinsky²⁶ hypothesized that *NLRP1* may constitute a predisposing genetic locus for human common diseases such as inflammatory disorders even if SLE has not been specifically considered. However, in our population, we could not correlate this data, since we did not found direct evidence between the presence of mutations and the development of SLE, neither to *NLRP1* gene nor to another NLR receptor, *NLRC4*. The same was observed to *AIM2* gene, also described as a good candidate because of its ability to recognize cytoplasmic DNA, and its possible role in the production of anti-DNA autoantibodies²⁷, however no association was found to the development of SLE in our patients.

Considering the inflammasome SNPs in SLE clinical manifestations, we observed the association between *IL-18* rs1946519 SNP [C>A] and malar rash, a common cutaneous alterations in the disease. Patients with malar rash presented a higher frequency of C/A and A/A genotypes in relation to the control group, conferring risk for the development of this symptom. This SNP is located in the promoter region of *IL-18* gene (known as -656) and is related to increased levels of serum IL-18, increasing an inflammatory response²⁸. Several

studies reported increased serum IL-18 in SLE patients²⁹⁻³¹. This IL-18 expression dysregulation might explain the elevated levels of IL-18 found in SLE subjects and its pathogenic function, since its levels are correlated with disease activity and renal, cardiovascular, and cutaneous manifestations of SLE³². Moreover, patients with Lupus nephritis (LN) had higher levels of serum IL-18 compared to those without LN, and kidney biopsies from the former showed IL-18-positive glomeruli³¹. Lin et al.²⁸ demonstrated that polymorphisms in -656, -607 and -137 positions of the promoter region of *IL-18* in SLE patients from Chinese population were associated with disease susceptibility, contributing to the genetic background of SLE pathogenesis. Although the inflammasome itself has not been well studied in relation to SLE cutaneous manifestations, the inflammasome-activated cytokine IL-18 has been proposed as an important pathogenic mediator of cutaneous lesions⁷. This cytokine is highly upregulated in biopsy samples of lesional skin from cutaneous lupus patients³³. IL-18 exposure induces upregulation of MHC class II and the chemokine CXCL10, which may be important for the recruitment and activation of inflammatory cells³⁴.

We observed yet association of *IL1B* rs1143643 SNP [C>T] with photosensitivity, another SLE clinical manifestation. Patients without photosensitivity presented a higher frequency for the minor T allele and T/T genotype in relation to patients with it and the control group, giving rise a less susceptibility to the development of this manifestation. This SNP is located in the intron 6 of *IL1B* gene, a splicing regulation region, that possible can generate a dysfunctional protein, what could be protective against the development of photosensitivity. A preliminary study showed that IL-1 blockade with anakinra provided therapeutic benefit for patients with SLE³⁵. Additionally, both IL-1 β and IL-18 are involved in disease progression in the mouse model of lupus, suggesting the involvement of at least one inflammasome in the production of them^{36,37}.

The gene expression profile of SLE patients for inflammasome components showed an upregulation for four inflammasome genes in both resting and LPS+ATP-stimulated

monocytes when comparing to healthy individuals. Remarkably, SLE patients displayed an upregulation of *NLRP1* (3.19-fold), *NLRC4* (2.58-fold), *CASP1* (3.87-fold) and especially *IL1B* (5.45-fold) genes in resting monocytes, suggesting us that inflammasome is constitutively activated in SLE patients in response to frequently damage signs release in the disease. Immune complexes formed secondary to antibody recognition of DNA or RNA antigens have been shown to stimulate inflammasome activation through upregulation of TLR-dependent activation of NF- κ B and subsequent activation of the NLRP3 inflammasome^{38,39}. In LPS+ATP-stimulated monocytes, SLE patients also showed an inflammasome upregulation for these genes in respect to controls, higher than in resting monocytes, which indicates that cells are dramatically sensitized to ligands and respond quickly for signs of stimulation, playing an important role in lupus progression. Thereby, the upregulation of inflammasome components is expected as in autoimmune diseases there are abundant release of DAMPs upon tissue damage, which may activate the inflammasome⁷. Therefore, besides the excessive IL-1 β secretion, the deregulated activation of these complexes may exacerbate the cell death, contributing to the inflammatory process and its maintenance in SLE disease.

These differences in inflammasome genes expression between patients and healthy controls are underlined by the results observed analyzing IL-1 β secretion in monocytes supernatants. In all studied conditions, the SLE monocytes secreted higher amounts of IL-1 β . The exact mechanisms responsible for the production and secretion of IL-1 β remain unclear, but two signals are traditionally required. The first signal, in our case LPS, induces the transcription of pro-IL-1 β and inflammasome subunits^{40,41}. The second signal promotes rapid activation of caspase-1 and then secretion of mature IL-1 β . This second signal is provided by reduction of intracellular K⁺ generated by ATP^{42,43}. Interestingly, the resting and ATP-stimulated monocytes from patients showed higher IL-1 β secretion, indicating the constitutive production of pro-IL-1 β in SLE monocytes independently of stimulus.

In conclusion, our results indicate that the inflammasome is an important player in lupus pathogenesis. SNPs in genes of inflammasome components are involved in the disease and a chronic expression of some of them was observed, indicating a dysfunction of this protein complex in SLE disease.

Acknowledgments and Funding

We would like to thank patients and control individuals for their participation. This work was supported by the following Brazilian funding agencies: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco).

Conflict of interest statement

There are no conflicts of interest.

References

1. Davidson A, Diamond B (2001) Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 345:340–350
2. Tsokos GC, Gordon C, Smolen JS (2007) Systemic lupus erythematosus: a companion to rheumatology. 1st ed. Mosby-Elsevier, Philadelphia
3. Petri M (2006) Systemic lupus erythematosus and related diseases: clinical features. In: Rose NR, Mackay IR (eds) *The autoimmune diseases*. 4th ed. Elsevier Academic Press, St Louis, pp 351–356
4. Tsao BP (2003) The genetics of human systemic lupus erythematosus. *Trends Immunol* 24:595–602
5. Croker JA, Kimberly RP (2005) Genetics of susceptibility and severity in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 17:529–537

6. Forabosco P, Gorman JD, Cleveland C, Kelly JA, Fisher SA, Ortmann WA, Johansson C, Johanneson B, Moser KL, Gaffney PM, et al (2006) Meta-analysis of genome-wide linkage studies of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 7: 609–614.
7. Kahlenberg JM, Kaplan MJ. The inflammasome and lupus: another innate immune mechanism contributing to disease pathogenesis? *Curr Opin Rheumatol* 2014; 26(5):475-81.
8. Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M et al. Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 2006; 24:317-27.
9. Shinkai K, et al. Cryopyrin-associated periodic syndromes and autoinflammation. *Clin Exp Dermatol* 2008;33:1–9.
10. Shaw, P.J., Michael F. McDermott, and Thirumala-Devi Kanneganti. Inflammasomes and autoimmunity. *Trends Mol Med*. 2011 February ; 17(2): 57–64.
11. Aksentijevich I, et al. The clinical continuum of cryopyrinopathies: novel CIAS1 mutations in North American patients and a new cryopyrin model. *Arthritis Rheum* 2007;56:1273–1285.
12. Magitta NF, et al. A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. *Genes Immun*. 2009;10:120–124.
13. Yang CA, Huang ST, Chiang BL. Sex-dependent differential activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in SLE macrophages. *Rheumatology* 2014; [Epub ahead of print].
14. Pontillo A, Girardelli M, Kamada AJ, Pancotto JA, Donadi EA, Crovella S, Sandrin-Garcia P. Polimorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2012; 45(4):271-8.
15. Yang CA, Huang ST, Chiang BL. Sex-dependent differential activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in SLE macrophages. *Rheumatology* 2014; [Epub ahead of print].
16. Lech M, Lorenz G, Kulkarni OP et al. NLRP3 and ASC suppress lupus-like autoimmunity by driving the immunosuppressive effects of TGF- β receptor signalling. *Ann Rheum Dis*. 2014 doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205496. [Epub ahead of print].
17. Yang Q, Yu C, Yang Z et al. Deregulated NLRP3 and NLRP1 inflammasomes and their correlations with disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2014; 41(3):444-52.
18. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997; 40(9):1725.
19. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992; 35:630-40.

20. Kosoy R, Nassir R, Tian C et al. Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America. *Hum Mutat* 2009; 30: 69-78.
21. Coelho AV, Moura R, Addobbati C et al. A rapid screening of ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco, Brazil. *Genet Mol Res* (in press)
22. Pontillo A, Vendramin A, Catamo E, et al. The missense variation Q705K in CIAS1/NALP3/NLRP3 gene and an NLRP1 haplotype are associated with celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2011;106(3):539–544.
23. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4):402-8.
24. Pontillo A, Brandao L, Guimaraes R, et al. Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil. *Autoimmunity* 2010;43(8):583–589.
25. Jin Y, Mailloux CM, Gowan K, et al. NALP1 in vitiligo associated multiple autoimmune disease. *N Engl J Med* 2007; 356(12):1216–1225.
26. Glinsky GV. Disease phenocode analysis identifies SNP guided microRNA maps (MirMaps) associated with human “master” disease genes. *Cell Cycle* 2008;7(23):3680–3694.
27. Choubey D, et al. Interferon-Inducible p200-Family Proteins as Novel Sensors of Cytoplasmic DNA: Role in Inflammation and Autoimmunity. *J Interferon Cytokine Res*. 2010
28. Lin YJ., Wan L., Lee CC., Huang C.M., Tsai Y., Tsai CH., Shin TL., Chao K., Liu C.M., Xiao J.W., Tasi FJ. (2007). Disease association of the interleukin-18 promoter polymorphisms in Taiwan Chinese systemic lupus erythematosus patients. *Genes Immun.*, 8, 302 – 307.
29. Wong CK, Li EK, Ho CY, Lam CW (2000) Elevation of plasma interleukin-18 concentration is correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 39:1078–1081.
30. Wong CK, Ho CY, Li EK, Tam LS, Lam CW (2002) Elevated production of interleukin-18 is associated with renal disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 130:345–351.
31. Park MC, Park YB, Lee SK (2004) Elevated interleukin-18 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 23:225–229
32. Sedimbi SK, Hagglof T, Karlsson MC. IL-18 in inflammatory and autoimmune disease. *Cell Mol Life Sci* 70(24):4795-4808, 2013.
33. Wang D, Drenker M, Eiz-Vesper B, et al. Evidence for a pathogenetic role of interleukin-18 in cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2008; 58:3205–3215.
34. Kahlenberg JM, Thacker SG, Berthier CC, et al. Inflammasome activation of IL-18 results in endothelial progenitor cell dysfunction in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2011; 187:6143–6156.

35. Ostendorf B, et al. Preliminary results of safety and efficacy of the interleukin 1 receptor antagonist anakinra in patients with severe lupus arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:630–633.
36. Calvani N, et al. Th1 cytokines in the pathogenesis of lupus nephritis: the role of IL-18. *Autoimmun Rev* 2005;4:542–548.
37. Voronov E, et al. IL-1 beta-deficient mice are resistant to induction of experimental SLE. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:109–116.
38. Shin MS, Kang Y, Lee N, et al. U1-small nuclear ribonucleoprotein activates the NLRP3 inflammasome in human monocytes. *J Immunol* 2012; 188:4769–4775.
39. Shin MS, Kang Y, Lee N, et al. Self double-stranded (ds)DNA induces IL-1b production from human monocytes by activating NLRP3 inflammasome in the presence of anti-dsDNA antibodies. *J Immunol* 2013; 190:1407–1415.
40. Yamamoto M, Yaginuma K, Tsutsui H, Sagara J, Guan X, et al. (2004) ASC is essential for LPS-induced activation of procaspase-1 independently of TLR associated signal adaptor molecules. *Genes Cells* 9: 1055–1067.
41. Kahlenberg JM, Lundberg KC, Kertesz SB, Qu Y, Dubyak GR (2005) Potentiation of caspase-1 activation by the P2X7 receptor is dependent on TLR signals and requires NF-kappaB-driven protein synthesis. *J Immunol* 175: 7611– 7622.
42. Perregaux DG, Gabel CA (1998) Human monocyte stimulus-coupled IL-1beta posttranslational processing: modulation via monovalent cations. *Am J Physiol* 275: C1538–1547.
43. Perregaux D, Gabel CA (1994) Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem* 269: 15195–15203.

8. Conclusões Gerais

1. Nossos resultados indicam que a presença de SNPs na região 3'UTR do gene *NLRP3* encontraram-se associadas a menor susceptibilidade ao desenvolvimento do LES.
2. A presença de SNPs na região 3'UTR do gene *NLRP3* encontraram-se associadas a menor susceptibilidade ao desenvolvimento de nefrite lúpica.
3. A expressão do gene *NLRP3*, através da quantificação relativa do RNAm em sangue periférico, apresentou-se aumentada nos pacientes com LES em relação ao grupo controle.
4. Neste estudo, não foi encontrada evidências estatísticas da associação dos polimorfismos nos genes *NLRP1*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL1B* e *IL18* à susceptibilidade ao LES em nossa população;
5. Os pacientes com LES que apresentaram SNPs na região promotora do gene *IL18* apresentaram risco aumentado para o desenvolvimento de alterações cutâneas;
6. Os pacientes com LES que apresentaram SNPs na região codificante do gene *IL1B* apresentaram menor risco para o desenvolvimento de fotossensibilidade;
7. Os genes *NLRP1*, *NLRC4*, *CASP1* e *IL1B* apresentaram expressão aumentada nos monócitos de pacientes com LES em relação aos dos indivíduos controle tanto na condição basal quanto após estimulação com LPS+ATP.
8. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os dados de quantificação de IL-1 β nos sobrenadantes de culturas dos grupos de LES e controles.

9. Anexo - Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



PROJETO DE PESQUISA

Título: "POLIMORFISMOS DOS GENES CODIFICANTES DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA: ASSOCIAÇÃO COM A SUSCEPTIBILIDADE AO LUPUS ERMATOSO SISTÊMICO E ARTRITE REUMATÓIDE"

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03065312.3.0000.5208

Pesquisador: PAULA SANDRIN GARCIA

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 105.992

Data da Relatoria: 11/09/2012

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Atendeu as as pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão para início da coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.