UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM BIOTECNOLOGIA

POLIMORFISMO DO GENE *PDCD1* EM PACIENTES DA AMAZÔNIA COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

LUIZ FERNANDO DE SOUZA PASSOS

Manaus
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM BIOTECNOLOGIA

LUIZ FERNANDO DE SOUZA PASSOS

POLIMORFISMO DO GENE *PDCD1* EM PACIENTES DA AMAZÔNIA COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Imunologia.

Orientador (a): Professora Doutora Maria Cristina dos Santos
Co-orientadora: Professora Doutora Janice Barros Teixeira

Manaus
2007

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dac

P289p

Passos, Luiz Fernando de Souza
Polimorfismo do gene PDCD1 em pacientes
lúpus eritematoso sistêmico / Luiz Fernando d
2007
79 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Maria Cristina dos Santos
Coorientador: Janice Barros Teixeira
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Univer
Amazonas.

1. Lúpus. 2. Genética. 3. Polimorfismo . 4. P
Imunorregulação. I. Santos, Maria Cristina dos

LUIZ FERNANDO DE SOUZA PASSOS

POLIMORFISMO DO GENE *PDCD1* EM PACIENTES DA AMAZÔNIA COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Imunologia.

Aprovado em 25 de JUNHO de 2007.

BANCA EXAMINADORA

_____
Professora Doutora Maria Cristina dos Santos.
Universidade Federal do Amazonas

_____
Professor Doutor Spartaco Astolfi Filho
Universidade Federal do Amazonas

_____
Professor Dr. Evandro Barbosa Ribeiro
Universidade Federal do Amazonas

_____
Professora Doutora Ezeni Pires Farias
Universidade Federal do Amazonas

_____
Professora Doutora Adriana Malheiros
Universidade Federal do Amazonas

A Leny,

A Ana Beatriz, Isabella, André e Letícia
pelo carinho, apoio e compreensão,
neste trabalho e no cotidiano de nossas vidas.

A Izolina, minha mãe, e José Alexandre, meu pai,
pelo exemplo e dedicação

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Cristina dos Santos, que me mostrou o caminho, com firmeza e sabedoria, e compreendeu minhas idiossincrasias.

Ao Mestre Maurício M. Ogusku e à Professora Doutora Aya Sadahiro, que deram preciosa orientação técnica e inestimável auxílio na execução das atividades laboratoriais.

Ao Professor Doutor Domingos Sávio Nunes de Lima, companheiro de longa jornada, amigo e colaborador.

Ao Professor Doutor Spartaco Astolfi Filho, à Professora Doutora Janice Barros Teixeira e à equipe do Laboratório de Biotecnologia.

À enfermeira Diana Xavier de Souza pela ajuda na coleta do grupo controle.

Às alunas Nathalia Gomes, Lindinha, Isabela Passos e Nayanne Cristina.

À Professora Edijane Garcia, pelo apoio nas questões de Estatística.

À Professora Doutora Júlia Salem que gentilmente colocou a nossa disposição as instalações do laboratório de micobactérias do INPA.

À equipe de Reumatologia da Universidade do Amazonas na pessoa da Dra. Sandra Lúcia Euzébio Ribeiro, Dra. Helena Lúcia Alves Pereira, Dra. Rosana Barros de Souza e Dra Anne Christine Neves e aos médicos residentes do Hospital Universitário Getúlio Vargas.

Ciência sublime mas hermética.

Total explicação da vida, nexo primeiro e singular.

Animais, plantas, paixões, enigmas,
tudo o que define o ser terrestre

afinal submetido à vista humana...

A máquina do mundo se entreabriu, majestosa e circunspecta...

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença complexa com diversas anormalidades clínicas e fisiológicas, unificadas pela produção de um grande número de auto-anticorpos, particularmente direcionados contra antígenos nucleares. Complexos de antígeno-anticorpo depositam-se em superfícies endoteliais e suscitam inflamação em diversos órgãos-alvo tais como pele, rins, articulações, pleura, sistema nervoso e sangue. Múltiplos genes e fatores ambientais interagem para deflagrar mecanismos fisiopatológicos. Apoptose excessiva e déficit de opsonização e fagocitose de restos apoptóticos são fenômenos centrais na patogênese do LES. Por outro lado, identificam-se inúmeros defeitos na regulação do sistema imunológico, acarretando hiper-reatividade na resposta antigênica, seja por ganho funcional em mecanismos estimulatórios, seja por perda funcional em mecanismos inibitórios.

Estudos de *linkage* identificaram no segmento cromossomial 2q37.3 forte ligação com LES. Nesse locus está o gene *PDCD1* (*programmed cell death* -1) que codifica o receptor de membrana PD-1, expresso em linfócitos ativados e macrófagos, que produz sinal inibitório ao contacto com seus ligantes em células apresentadoras de antígeno e em células somáticas de tecidos periféricos. Camundongos *knocked out* para o gene *PDCD1* apresentam síndrome lupus-símile e anticorpos antinucleares.

Um haplótipo contendo o alelo A da mutação G/A na posição intrônica 7146 no gene *PDCD1* (rs11568821) está associado ao fenótipo lúpico em populações de origem escandinava, mexicana e euro-americana; com nefrite lúpica em outra coorte sueca; com anticorpos anticardiolipina em lúpicos de Philadelphia; e em lúpicos pediátricos na cidade do México. Contrastantemente, na Espanha o alelo 7146-A ocorreu mais nos controles do que em pacientes com LES. Esse segmento intrônico é sítio de ligação do fator de transcrição Runx-1, o que reforça a possibilidade desse SNP atuar na patogenia da doença. Esses estudos de associação precisam ser replicados e confirmados em outras populações de diferentes ancestralidades.

No presente estudo, testamos a associação com LES do alelo A na posição 7146 de *PDCD1* em 207 pacientes com quatro ou mais critérios do American College of Rheumatology para LES e 202 controles pareados da mesma região geográfica. Um segmento de 180 pares de base foi amplificado por PCR e digerido pela enzima de restrição *Pst*-1. A freqüência do alelo A foi de 6.9 % em controles e de 8,2 % em pacientes lúpicos, diferença sem significância estatística. Subgrupos lúpicos, tais como envolvimento renal, trombose, lúpus pediátrico e outros caracteres não diferiram dos controles na freqüência do alelo A.

Nossos achados, em conjunto com os estudos prévios citados, suportam a interpretação de que o gene *PDCD1* deve estar associado ao LES, mas que a posição 7146 não deve ter vínculo causal, podendo apenas estar em desequilíbrio de ligação com outro hipotético SNP responsável pela repercussão funcional e partícipe da doença.

Palavras-chave: Lúpus. Genética. Polimorfismo. PD1. Imunorregulação.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a complex disease with multiple clinical and physiological abnormalities held together by the production of a great number of auto-antibodies, most of them directed against nuclear material. Antigen-antibody complexes deposited upon endothelial surfaces prompt inflammation on target organs like the skin, kidneys, nervous system, blood, pleura and joints. Admittedly, many genes should act together, along with environmental factors, to launch disease pathways. Apoptosis is a central phenomenon in this scenario, with intrinsic incapacity to opsonise or digest nuclear debris. On the other hand, several abnormalities have been ascribed to regulatory and executive arms of the immune system which rend it over-reactive to antigenic challenge. Gain of function in stimulatory signaling pathways or loss of function in inhibitory ones may result in such over-reactivity.

Linkage studies have identified a locus in chromosome 2q37.3 strongly linked with SLE. That is the locus of gene *PDCD1* (programmed cell death-1), which codes for the membrane receptor PD-1, expressed in activated lymphocytes and macrophages, having an inhibitory action when contacting its ligands on antigen presenting cells and in other somatic tissues. Failure of this mechanism could result in autoimmunity, as long as a source of auto-antigens is provided. Mice knocked-out for the *PDCD-1* gene present with a lupus-like syndrome and anti-nuclear antibodies.

A haplotype containing the A allele on a G/A mutation at intronic position 7146 (rs11568821) of *PDCD1* demonstrated strong association of with SLE in Scandinavian, Mexican and Euro-American patients, in another cohort from Sweden with renal disease, in patients from Philadelphia with anti-phospholipid antibodies and in patients from Mexico City with pediatric SLE. Otherwise, in Spain, 7146-A occurred significantly more in matched controls than in SLE patients. Intronic segment 7146 is a binding site for transcription factor RUNX1, so it is attractive to suppose that this SNP could play an important role in lupus pathogenesis. The above mentioned association studies call for replication and confirmation in other populations with diverse geographic provenience and different ancestry.

We tested the association with SLE of allele A at 7146 position of *PDCD1* in 207 patients attended at the University Hospital in Manaus, Amazonas, Brazil, fulfilling at least four of the 11 criteria of the American College of Rheumatology, and 202 matched controls from the same region. A DNA segment of 180 bp was amplified by polymerase chain reaction and then digested by restriction enzyme *Pst*-1. The frequency of allele A was 6,9% in controls and 8,2% in SLE patients, a difference with no statistical significance. SLE subgroups such as kidney disease, thrombotic disease, pediatric age and other features did not differ from controls in allele A frequency.

Our findings, along with those of previous studies, support the view that *PDCD1* gene may be indeed associated with SLE, but that 7146 position may not be the causal SNP, but could be in linkage disequilibrium with another putative SNP, the one to blame for functional derangement and disease.

Key-words: Lupus. Genetics. Polymorphism. PD1. Immune-regulation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição demográfica de casos e controles, com quantificação por sexo, idade, procedência e cor autodefinida..... 54

Tabela 2 – Freqüências alélica, genotípica e de carreadores do alelo A e G do polimorfismo da posição 7146 do gene *PDCD1* em indivíduos casos e controles..... 55

Tabela 3 – Freqüência do alelo A no grupo de casos e no grupo controle, conforme categorias demográficas sexo, procedência e cor da pele autodefinida..... 56

Tabela 4 – Freqüência do alelo A no grupo de casos conforme estratificados conforme subfenótipos que indicam as características clínicas da doença.....57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias imunopáticas possíveis no LES.....16

Figura 2 - Estrutura do gene *PDCD-1*..... 38

Figura 3 - Representação esquemática da organização de exons em diferentes variantes de clivagem (*splicing*) de PD-1..... 39

Figura 4 - Cinco haplótipos com sete SNPs em famílias escandinavas, e respectivas prevalências em pacientes lúpicos e em controles sadios..... 43

Figura 5 - Seqüência nucleotídica adjacente à posição 7146 no intron 4 do gene *PDCD1*, com polimorfismo g/a em destaque 50

Figura 6 – Gel de agarose a 4% com o produto da digestão pela enzima *Pst* I do segmento de DNA amplificado do gene *PCDC1*. 52

LISTA DE SIGLAS

BLyS – “B Lymphocyte Stimulator”

CD – “Cluster Designation”

DNA – Ácido Desoxirribonucleico.

FCRγ – Receptor do Fragmento FC da imunoglobulina Gama

ICoS – “Imune Co-Stimulator”

IL – Interleucina

LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico.

MHC – “Major Histocompatibility Complex”

PD1 – “Programmed Cell Death-1”

PDCD1 – “Programmed Cell Death-1”

PD-L1 – “Programmed Cell Death Ligant-1”

PD-L2 – “Programmed Cell Death Ligant-2”

RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism”

RNA – Ácido Ribonucléico

SNP – “Single Nucleotide Polymorphism”

TCR – “T Cell Receptor”

TGF – “Transforming Growth Factor”

TNF – “Tumoral Necrosis Factor”

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO..... 13

2. REVISÃO DE LITERATURA..... 15
2.1 LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO: AUTO-IMUNIDADE, GENÉTICA E MEIO AMBIENTE..... 15
2.1.1 Proliferação B e apoptote..... 16
2.1.2 Depuração de restos apoptóticos..... 20
2.1.3 papel do linfócito T..... 22
2.1.4 Citocinas e genes com assinatura do IFN..... 25
2.1.5 Epigenética e Xenobióticos..... 26
2.1.6 Modulação hormonal..... 29
2.1.7 Susceptibilidade do órgão alvo..... 31
2.2 GENE *PDCD1* E A MOLÉCULA PD-1 NA FUNÇÃO IMUNE NORMAL E NO LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO..... 33

3. METODOLOGIA..... 43
3.1 OBJETIVOS..... 43
3.1.1 Geral..... 43
3.1.2 Específicos..... 43
3.1.3 Delineamento da pesquisa..... 44
3.1.4 Hipótese de nulidade 44

4. MATERIAIS E MÉTODOS..... 45
4.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA NA PESQUISA..... 45
4.1.1 Aprovação pelo Comitê de Ética na Pesquisa..... 45
4.1.2 Formação dos grupos de casos e controles..... 45
4.1.3 Extração do DNA..... 48
4.1.4 Quantificação do DNA extraído..... 49
4.1.5 Amplificação do DNA e identificação do alelo polimórfico..... 49

5. RESULTADOS..... 52

6. DISCUSSÃO 58

7. CONCLUSÃO 67

REFERÊNCIAS..... 68

1. INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica com múltiplas manifestações clínicas, que podem envolver diversos órgãos e sistemas, incluindo pele, articulações, membranas serosas, rins, sistema nervoso, glóbulos sangüíneos, coagulação e outros (WALLACE 2002, TAN 1982). O denominador comum que garante unidade nosológica em meio à tamanha diversidade clínica e patológica é a presença de auto-imunidade direcionada contra antígenos nucleares (HAHN 1998). Anticorpos antinucleares, por ação direta ou por depósito em diferentes leitos vasculares, acarretam inflamação e disfunção em diferentes tecidos, gerando os quadros clínicos múltiplos do LES (ALARCON-SEGOVIA 2004).

O entendimento da imunopatogenia do LES é um passo fundamental para seu correto manejo diagnóstico e terapêutico e para o desenvolvimento de novos fármacos direcionados a alvos estratégicos. Entretanto, a montagem de um esquema imunopatogenético global para o LES não é matéria fácil, posto que múltiplas anormalidades imunológicas já identificadas devem ser explicadas e integradas em uma moldura comum. São as grandes vias imunopatogênicas que desembocam em um escoadouro final que é o lúpus clínico. Entre essas anormalidades destacam-se: hiperatividade de linfócitos B com proliferação policlonal e hipergamaglobulinemia; aumento da taxa de apoptose, como observado em linfócitos e queratinócitos, com dificuldade de eliminação dos restos apoptóticos; presença de anticorpos antinucleares da classe IgG com maturação de afinidade, o que implica em serem gerados por um processo T-dependente e dirigido para antígeno; disfunção na regulação de linfócitos T; dificuldade na circulação e remoção de complexos antígeno-anticorpo, com eventual deposição tissular; alteração no perfil de atividade de diversas citocinas, contribuindo para um

ambiente pró-inflamatório em tecidos-alvo, mas predominantemente Th2 sob influência da IL-4 em sítios linfopoiéticos; importante modulação hormonal, que se reflete na preferência do LES pelo gênero feminino e faixa etária pós-puberal; e importante participação de desencadeantes ambientais, que se reflete na concordância de apenas 50% em gêmeos monozigóticos.

Cada um desses múltiplos setores é sujeito a determinantes genéticos próprios, o que resulta em dizer que no LES um número expressivo de genes, na ordem estimada de uma centena, pode de alguma forma participar e interagir na patogenia da doença. Polimorfismos genéticos de hipofunção, hiperfunção, hipoexpressão ou hiperexpressão formam a base para a participação de cada gene na composição e heredabilidade da doença. Cada paciente, porém, é individual e carrega uma combinação particular de apenas alguns desses genes polimórficos, o que contribui para a diversidade – genética, imunológica e clínica – do LES. A busca por esses genes polimórficos é uma maneira árdua, mas racional de dissecar a doença, trazendo à tona as vias imunopatogênicas possíveis e as atuantes em um determinado paciente, permitindo listar e hierarquizar os polimorfismos, e definir alvos para o desenvolvimento de terapia direcionada.

Um possível polimorfismo genético ocorre no gene *PDCD-1,* com lócus em 2q.37.3, codificante da proteína PD-1, que regula negativamente a resposta de linfócitos T. A troca de uma guanina por uma adenina na posição intrônica 7146 altera o sítio de ligação do fator de transcrição RUNX-1, com possível hipoexpressão da molécula inibitória PD-1, o que, em ação conjunta com outros genes e fatores ambientais, acarretaria hiper-responsividade, proliferação policlonal e apoptose excessiva de linfócitos B, concorrendo para a formação de anticorpos antinucleares. No presente trabalho é relatada a freqüência do polimorfismo 7146-G/A do gene *PCDC-1* em população lúpica acompanhada no Estado do Amazonas e em um grupo controle de indivíduos sadios.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO: AUTO-IMUNIDADE, GENÉTICA E MEIO AMBIENTE

No LES algumas alterações básicas da resposta imunológica e da resposta inflamatória costumam estar habitualmente presentes, as quais contribuem para a produção de anticorpos antinucleares patológicos e para a configuração final da doença. Todo enquadramento teórico de fenômenos naturais tende ao reducionismo e não deve ser encarado como uma fotografia estanque. Assim, essas vias imunopáticas devem ser entendidas como possibilidades funcionais, que variam de doente para doente, que às vezes se entrelaçam e se somam com sinergismo, às vezes se anulam com antagonismo, e tem suporte em diferentes polimorfismos genéticos e moduladores ambientais. Vamos aqui analisar separadamente o distúrbio na geração de células apoptóticas e depuração de restos apoptóticos; a hiper-reatividade de linfócitos B e a proliferação B policlonal; a mudança no padrão de produção de anticorpos antinucleares, de naturais para patológicos, de classe IgG, com maturação de afinidade dependente de célula T e dirigida por antígeno; o distúrbio de regulação de linfócitos T; o distúrbio no processamento de imuno-complexos; o distúrbio na produção de citocinas configurando um ambiente pró-inflamatório em órgãos-alvo e um ambiente Th2 em setores linfopoiéticos; uma disfunção imuno-neuro-endócrina envolvendo esteróides gonadais, prolactina e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e seus receptores periféricos; e finalmente a afinidade e susceptibilidade de órgãos-alvo à agressão imunopática, seja por depósito de complexos antígeno-anticorpo, seja por citotoxicidade direta .

Alguns defeitos genéticos podem atuar em mais de uma dessas vias. Algumas só têm expressão funcional quando moduladas por desencadeantes ambientais. A figura 1 mostra um esquema possível, que tenta integrar e organizar temporalmente esses grandes caminhos que levam ao lúpus clínico.

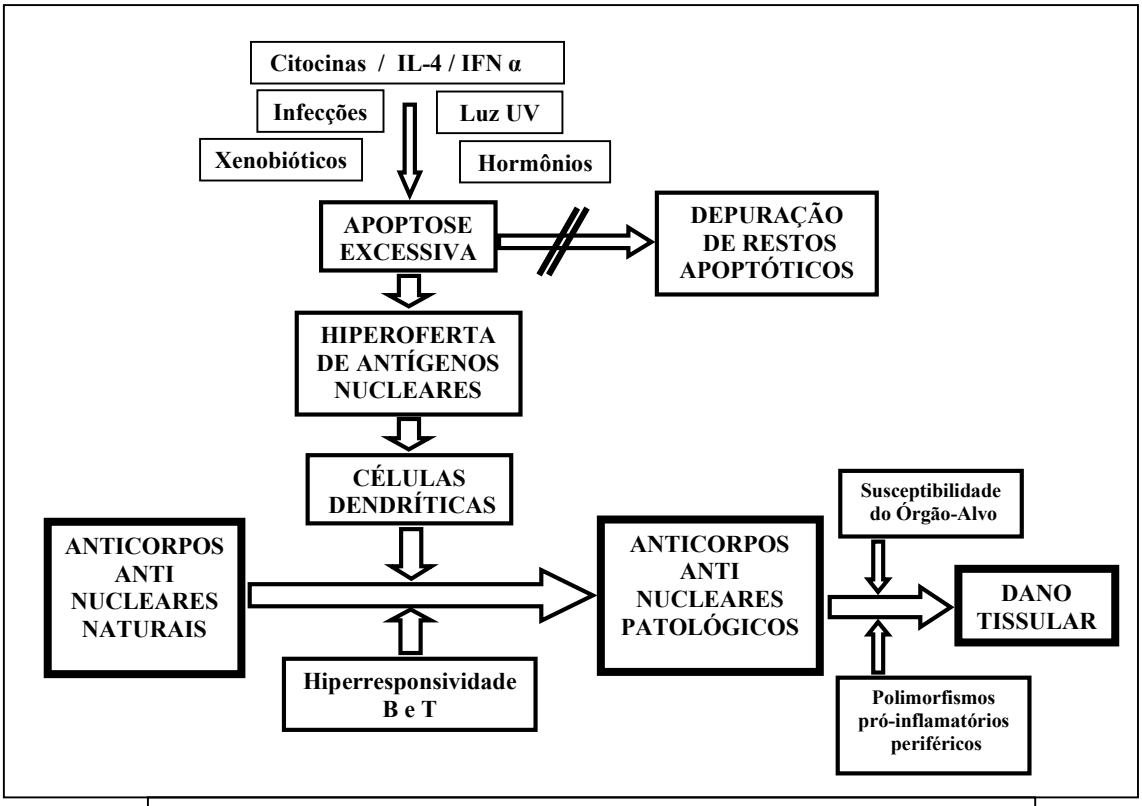

Figura 1. Vias imunopáticas possíveis no LES. Adaptado de Passos LF, 2001

2.1.1 Proliferação de linfócitos B e apoptote

Proliferação policlonal de linfócitos B e hipergamaglobulinemia são observações antigas e notórias na patogenia do LES. Mais recentemente tem sido observado o aumento da taxa de apoptose em linfócitos e monócitos circulantes em sangue periférico (EMLEN 1994, ROSE 1997). Esse fato suscita duas indagações: o que leva linfócitos B à proliferação

policlonal e à eventual apoptose? E quais as conseqüências funcionais da excessiva formação de restos apoptóticos?

Expansão oligoclonal sob demanda fisiológica, induzida por antígeno, é um atributo constitutivo dos linfócitos em geral. O toque inicial é o próprio antígeno, devidamente apresentado no ambiente restrito do MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe II. As moléculas receptoras de co-estímulo na superfície do linfócito T CD4+ dão em seguida o segundo sinal: moléculas CD28 um sinal estimulatório, e moléculas CTLA-4 um sinal inibitório, devidamente acionadas pelos seus ligantes comuns CD-80 e CD-86 (também chamados B7-1 e B7-2) presentes em linfócitos B, macrófagos e células dendríticas. Em seguida o sinal estimulatório é mantido pela molécula ICOS (acionada pelo ICOS-L) e o sinal inibitório pela molécula PD-1 (acionada pelos ligantes PD-L1 e PD-L2) (FREEMAN 2000). Para a ativação de linfócito B, a molécula CD-40, também estimulatória, é acionada pelo CD-40-ligante (CITORES 2004) presente em linfócitos T, como também as moléculas TACI e BMCA(GROSS 2000), acionadas por seu ligante, a molécula BLyS (STOHL 2002), presente em macrófagos, monócitos e células dendríticas. Receptores de baixa afinidade para o fragmento Fc de imunoglobulina G presente em imuno-complexos podem sinalizar linfócitos B de forma inibitória (FcγR-II-B) ou de forma estimulatória (FcRγIIA, FcRγIIIA e FcRγIIIB), assim como células endoteliais em órgãos-alvo periféricos. As moléculas BTLA e CD-22 também dão sinais inibitórios.

Polimorfismos genéticos que alterem positivamente a função das moléculas estimulatórias ou negativamente as moléculas inibitórias carregam a potencialidade de tornar o linfócito B hiper-reativo, desenvolvendo expansão mitótica, que acaba ou em apoptose ou em diferenciação em célula plasmática e produção de imunoglobulinas. Sendo um defeito genômico, a expressão é pan-linfocítica e a proliferação é policlonal. Vários polimorfismos genéticos nessas moléculas regulatórias de linfócito B tem sido descritos em populações

lúpicas (HUTLOFF 2004, ZHANG 2001, DAVIDSON 2005) geralmente com prevalências distintas em diferentes etnias e ancestralidades.

Por outro lado, as infecções em geral têm o potencial de gerar proliferação linfocítica fisiológica e autolimitada, mas que em um cenário lúpico redunda em maior oferta apoptótica, piora pontual da disfunção auto-imune e exacerbação clínica da doença. Além da via usual, dirigida por antígeno T-dependente, estímulo mais intenso e mais amplo ocorrerá com agentes infecciosos que disponham dos chamados superantígenos bacterianos ou virais, que ativam diretamente o receptor B ou T, gerando expansão mitótica independente de antígeno. Alguns patógenos, entretanto, são mais incisivos por terem intrinsecamente a capacidade de provocar uma proliferação B policlonal, como é o caso do *Plasmodium falciparum* e do vírus de Epstein-Barr (EPV). No caso do plasmódio, ocorre a produção do chamado "mitógeno da malária", que funciona como um mecanismo de escape que coloca o sistema imune em ação de forma inespecífica e descoordenada, tirando o foco da ação antimalárica que se fazia necessária. Na malária é bem documentado o excesso apoptótico e a formação de anticorpos antinucleares (BALDE 1995).

A participação do EBV no LES é mais complexa (GROSS 2005), pois esse vírus incorpora-se ao genoma de linfócitos B, provocando um distúrbio proliferativo permanente. Diz-se que o EBV "imortaliza" o linfócito B, mas essa expressão não é feliz, pois *in vivo* o linfócito não fica "imortal" e eventualmente morre por apoptose. A prevalência do EBV em lúpicos é rigorosamente 100%. Não há lúpus sem EBV. Talvez a aquisição do EBV, que ocorre na infância e adolescência, seja, junto com o alvorecer estrogênico da puberdade, o relógio que desperta o processo imunopático da doença.

Outra alteração que faz sentido fisiologicamente, já tendo polimorfismos descritos em populações lúpicas, é a hiperexpressão da molécula FAS-ligante, que é o sinal definitivo que desencadeia a apoptose em um linfócito B ativado, que apresenta para sua auto-extinção a

molécula FAS em sua superfície. Outra alteração significativa é a ocorrência de polimorfismos nas moléculas do sistema imune inato chamadas "Toll-like-Receptors" (TLR) que reconhecem principalmente padrões moleculares associados aos patógenos ou padrões repetitivos como segmentos de DNA, principalmente o TLR-9, que preferencialmente reconhece DNA CpG não metilado, e possivelmente outros TLR, como o TLR3, TLR4, TLR7 e TLR8 (BACALLA, 2007; RAHMAN, 2006, LENERT, 2006). No lúpus, complexos de imunoglobulina com DNA e nucleossomas estimulam duplamente o linfócito B (PAPADIMITRAKI ED, 2006) que acopla o fragmento Fc por meio do FcRγ ou do receptor de complemento (CR2), e o resíduo de DNA reconhecido pelos TLRs (MEANS 2005). Moléculas polimórficas de TLR-9 com resposta exacerbada geram, ao entrar em contato com complexos-imune anti-DNA, um círculo vicioso ou um moto-contínuo, na seguinte seqüência: complexos Ig-DNA → TLR-9 e FcγR → proliferação de linfócitos B → apoptose → antígenos nucleares → ativação de linfócitos B → anticorpos antinucleares → complexo Ig-DNA→ TLR-9 e FcγR → → →.

Outra célula propensa entrar em apoptose é o queratinócito da epiderme. Quando estimulado por luz ultravioleta (UV), o queratinócito fica em estado de ativação, libera linfocinas pró-inflamatórias e acaba por sofrer apoptose, enquanto as células da basal proliferam para manter o plantel de queratinócitos estável (HUBER 2006). É notório o fato da luz solar exacerbar o lúpus, não só em nível local, cutâneo, mas também em nível sistêmico – articular e renal (MORISON 2004). Queratinócitos em cultura submetidos a um choque de luz UV servem como modelo *ex-vivo* de produção de antígenos nucleares por células em processo apoptótico (CASCIOLA-ROSEN 1997).

2.1.2 Depuração de restos apoptóticos

A apoptose é um fenômeno normal, rotineiro, fisiológico. Mesmo ocorrendo em ritmo mais acelerado, o organismo dá conta de processar os seus resíduos e eliminá-los de maneira rápida e eficaz.

É um processo organizado, um desmonte metódico e limpo de toda arquitetura celular, executado por enzimas específicas, incluindo a família das caspases, que atuam preponderantemente no citoesqueleto e na cromatina. Clivagem da ligação do citoesqueleto com a membrana citoplasmática torna essa membrana livre, formando "bolhas" (em inglês "*blebs*") citoplasmáticas. Clivagem da cromatina libera partículas chamadas nucleossomas, que constam de oito unidades de histona envoltas por fita de DNA. Resultam fragmentos com números variáveis de nucleossomas, que migram equidistantemente numa eletroforese, dando o aspecto de escadinha (*ladder*), patognomônico da apoptose. A membrana celular recobre então restos nucleares e organelas citoplasmáticas, formando corpúsculos apoptóticos que serão ingeridos por macrófagos, neutrófilos e mesmo fagócitos não profissionais como células epiteliais e mesenquimais. Uma vez fagocitados, os corpúsculos apoptóticos serão digeridos por proteases e DNAses nos lisosomas das células ingestoras. Ressalte-se que o comportamento dessas células fagocíticas é silencioso, com secreção de citocinas antiinflamatórias (IL-10, TGFα) e ausência de processamento imunogênico do conteúdo ingerido (COHEN PL 2007). Quando o citoesqueleto se destaca da membrana citoplasmática, ocorre a inversão de sua polaridade, com fosfolipídeos que antes faceavam o meio interno da célula agora revertendo para o meio externo. Com essa inversão, a membrana se desliga de moléculas como a fibronectina, vitronectina e outras âncoras da matriz intersticial, o que facilita o tráfego dos corpúsculos apoptóticos até o fagócito. O processo de ingestão é facilitado por diversas opsoninas, como o complemento, a proteína C-reativa e a lectina de

ligação da manose (MBL – *manose binging lectin*) (TAKAHASHI 2005). Fosfolipídeos resultantes da inversão da membrana citoplasmática interagem com anticorpos antifosfolipídicos naturais, que fixam complemento com subseqüente opsonização. Demonstrou-se que antígenos nucleares incorporam-se nas bolhas (*blebs*) citoplasmáticas (CASCIOLA-ROSEN 1997), onde são reconhecidos por anticorpos antinucleares naturais, sendo, portanto, mais um elemento para opsonização dos restos apoptóticos.

Esse mecanismo de limpeza – elegante, rápido, silencioso e eficaz – pode não funcionar de forma tão perfeita em duas situações especiais: em primeiro lugar, caso ocorra limitação na opsonização dos restos apoptóticos por deficiência de moléculas intermediárias; em segundo lugar caso ocorra deficiência da enzima DNAse nas células fagocíticas, incapacitando a digestão lisossomial do DNA ingerido. Exatamente essas duas anormalidades têm sido registradas no LES (PASSOS 1997, SIGAL 2007). Alelos nulos de C1q e C4 encerram alta probabilidade de desenvolvimento de LES, da ordem de 95% no caso de C1q. Ressalte-se que essas frações do sistema complemento (C1q e C4) têm atividade intrínseca de opsonina. Como as vias iniciais do sistema complemento são redundantes, casos de alelia nula não são incompatíveis com a vida, desde que haja preservação da via final, possibilitando a ativação de C9. No caso do gene C4, componente do MHC no cromossoma 6, ocorre um polimorfismo quantitativo, pois o gene repete-se de uma a quatro vezes em cada haplótipo, independente de quaisquer mutações pontuais (SNP). Indivíduos com oito cópias são hiperexpressores de C4; indivíduos com duas cópias são hipoexpressores, e susceptíveis ao LES (YU, 2004). Polimorfismos genéticos no gene da proteína C-reativa (TSAO 1999) e da *manose binding lectin* (MBL) também estão associados ao LES em algumas etnias estudadas, também por conta de insuficiência opsonisatória de restos apoptóticos. Por outro lado, polimorfismos com hipoexpressão de DNAse I e DNAse II tem sido registrados em algumas

populações lúpicas (SHIN, 2005). Camundongos *knock-out* para DNAse I e II desenvolvem quadros patológicos compatíveis com LES (TSUKUMO, 2004).

Nessas situações corpúsculos apoptóticos acumulam-se no meio externo e o organismo lança mão de células dendríticas para tentar fagocitose e digestão (ALBERT 1998). Sem grande sucesso, porém, e com uma agravante: as células dendríticas processam o material ingerido ao seu estilo, de forma imunogênica, apresentando fragmentos do antígeno em moléculas HLA de classe II, com todas os elementos de co-estímulo necessários para desencadear uma resposta proliferativa em linfócitos T auto-reativos virgens, que se mantinham anérgicos graças aos mecanismos usuais de tolerância periférica (WATTS, 2007).

2.1.3 Papel do linfócito T

"Horror autotóxico" não existe. Hoje se sabe que auto-anticorpos naturais estão presentes desde o nascimento, perduram por toda a vida, e cumprem importantes funções homeostáticas. São produzidos pelos linfócitos do tipo B1, CD5 positivos, localizados na zona marginal de linfonodos e do baço, e na cavidade peritoneal de murinos, têm baixa capacidade mitótica, produzem auto-anticorpos da classe predominantemente IgM, são de linhagem germinativa, poli-reativos e de baixa afinidade. Reagem via BCR (*B cell receptor*) com auto-antígenos ubíquos, livres, como nucleossomas, proteínas do citoesqueleto, membranas fosfolipídicas, em uma resposta T-independente. Os auto-anticorpos ditos naturais produzidos por linfócitos B1 atuam como *scavengers* de restos apoptóticos por sua capacidade de fixar complemento para gerar opsonização. Reagem também com microorganismos diversos, em ligação de baixa afinidade, comportando-se como um elemento do sistema inato de defesa. Como toda célula B, as células B1 são apresentadoras de antígeno (MONTECINO-RODRIGUEZ, 2006). Caso o antígeno – endógeno ou exógeno –

seja apresentado ao linfócito T por célula dendrítica, e esse linfócito T ativado reconheça a célula B1 e a co-estimule com CD-40-L, a célula B1 pode despertar e entrar em processo de mudança de classe (*shift* de IgM para IgG ou IgA), passando a apresentar mutação somática na cadeia hipervariável da imunoglobulina, processo denominado de maturação de afinidade, sofrendo expansão mitótica em centro germinativo (MILNER 2005). Desta forma, o linfócito T sensibilizado poderá desencadear uma resposta B madura, IgG, hipermutada, através de um linfócito B *naïve*, de zona folicular, ou através desses linfócitos B1 de zona marginal, que funcionariam como um molde básico inicial – inato e inespecífico – para microorganismos diversos, que depois melhorará com mudança de classe e afinamento de especificidade (MILNER 2005).

Os anticorpos antinucleares patológicos e patogênicos encontrados no LES apresentam algumas diferenças em relação aos anticorpos antinucleares naturais. São IgG, de alta afinidade, com mutações em região hipervariável que indicam um desenvolvimento T-dependente, dirigido pelo antígeno. A participação de células dendríticas na fagocitose de restos apoptóticos pode explicar a ativação dessas células T auto-reativas virgens. A existência de células T com afinidade por auto-antígenos é possível uma vez que o expurgo de células auto-reativas no timo não é um fenômeno radical, podendo haver escape de células com afinidade intermediária pelo auto-antígeno, uma vez que a seleção negativa e deleção clonal são reservadas para os auto-antígenos de alta afinidade (ABBAS KA, 2004).

Por outro lado, defeitos intrínsecos da regulação de linfócitos T podem agir como fatores facilitadores ou amplificadores dessa resposta T-dependente (HOFFMAN 2004). O complexo CD3 é um hexâmero formado por um par de cadeia γ-ε, um par ε-δ e um par ζ-ζ. Nambiar e Tsokos (2003) descrevem em 77% dos pacientes lúpicos a expressão nula da cadeia zeta (ζ), mesmo ao nível de RNA, de forma constitutiva, independente de fase clínica ou tratamento, acompanhada de hiper-resposta citoplasmática à ativação de CD3, e

conseqüente expressão aumentada das moléculas CD-40-ligante e FAS-ligante, com o potencial de ativar e proliferar células B (CD-40), e ao mesmo tempo induzir sua apoptose (FAS).

Quando um processo auto-imune envolve ativação de célula T é provável que inclua restrição pelas moléculas HLA de classe II. E isso efetivamente tem sido observado no LES. O impacto dos polimorfismos em HLA-D é muito menor no lúpus do que em outras doenças auto-imunes como a artrite reumatóide e o diabetes tipo I. Registra-se em caucasianos uma associação com o HLA-DR2 e HLA-DR3, representados nos haplótipos (DRB1*1501(DR2)/DQB1*0602 e DRB1*0301(DR3)/DQB1*0201) (GRAHAM 2002). O haplótipo com DR3 apresenta desequilíbrio de ligação intenso com genes do HLA de classe III, quase não havendo variabilidade nos alelos apurados, tornando incerta a conclusão de que o DRB1*0301(DR3) seja, isoladamente, um alelo implicado. Associações do HLA têm sido mais observadas com subfenótipos do LES do que propriamente com o fenótipo global definido pelos critérios do American College of Rheumatology. Assim, associações HLA com determinados anticorpos antinucleares foram relatadas – anti-Ro e anti-La com certos alelos DR-Q; anti-Sm e anti-RNP com DR4/DQ3; anti-fosfolípidio com DR4/DQ7.

Em 1989 Harley levantou a interessante hipótese de que a heterogeneidade clínica do LES se deveria à diversidade polimórfica dos HLAs de classeII (HARLEY 1989). Havendo no processo apoptótico a produção de múltiplos antígenos nucleares (RIEMEKASTEN 2005), a capacidade de reação a esses antígenos dependeria da capacidade de interação deles com as moléculas de HLA de classe II, que variam de pessoa para pessoa, o que determinaria o tipo de anticorpo antinuclear que o indivíduo é capaz de produzir, talvez definindo assim o subfenótipo de lúpus que o indivíduo poderia de desenvolver.

2.1.4 Citocinas e genes com assinatura do IFN

Em qualquer doença inflamatória crônica de causa auto-imune é difícil saber se o comportamento de uma determinada citocina é um defeito genético primário ou se é um epifenômeno, secundário ao processo inflamatório em si. Analisar uma citocina, ou um conjunto de citocinas numa doença inflamatória crônica é uma tarefa realmente complexa, pois as citocinas são muitas, uma pode alterar a expressão de outra, e seus níveis variam de momento a momento conforme a atividade da doença, a terapia empregada e até o órgão de onde a amostra foi retirada (SÁNCHES E, 2006). De uma maneira geral, admite-se que no LES há uma predominância de citocinas de padrão Th2, o que está de acordo com a patogenia da doença, mediada por expansão B, anticorpos e complexos imune, diferentemente da artrite reumatóide e diabetes tipo I, que tem um padrão Th1 e patogenia mediada por células T efetoras, que invadem o órgão alvo e aí promovem destruição (insulite no diabetes) ou proliferação (PANAYI 1992) (pannus na artrite reumatóide). Polimorfismos genéticos em IL-10 (CHONG 2004), IL-6, IL-4, IL-18, TNFα e outras citocinas e respectivos receptores tem sido descritos sem muita consistência em pacientes lúpicos, com positividade em algumas etnias, em outras não (MAGNUNSON 2001).

Por outro lado, os chamados "genes com assinatura de interferon" constituem um padrão de expressão protéica que se manifesta com boa reprodutibilidade no LES (KIROU 2005). Trata-se de um conjunto de peptídeos – citocinas, receptores de membrana e citoplasmáticos, fatores de transcrição – que se expressam sincronicamente em linfócitos B, T, monócitos, macrófagos e células dendríticas, após ativação dos respectivos receptores de IFN-α (IFNAR). Esse conjunto protéico tem uma função global de imunoestimulação, usualmente para defesa anti-viral, é bem detectado em *microarrays* de RNA (HAN 2003), e correlaciona-se fortemente com a atividade e a severidade do lúpus. O receptor IFNAR é ativado por todos os interferons-tipo-I, que incluem 13 subtipos de interferon-α (13 genes

distintos) e mais o INF-β, INF-ω, INF-ε e INF-κ. Após acoplamento com um dos seus ligantes, o IFNAR aciona a tirosina-cinase-2 (TYK-2) e a janus-cinase-1 (JAK-1) e vários ativadores de transcrição, entre eles o IRF-5 (*interferon regulatory factor-5)* e os STAT–1-6, que desencadeiam a resposta transcriptiva desse conjunto de proteínas imuno-estimulatórias. O grande produtor dos interferons-tipo-I no lúpus é a célula dendrítica plasmocitóide (*PDC - plasmocytoid dendritic cell,*), quando em contato com complexos imunes Ig-DNA, havendo interação do ácido nucléico com o TLR-9 (*Toll-Like Receptor-9*) e da imunoglobulina com o receptor de Fc do tipo FcγRIIA. Essa resposta poderia ser encarada, portanto, como um fenômeno meramente fisiológico, conseqüência do excesso de imuno-complexos no LES. Por outro lado, foram descritos polimorfismos genéticos na TYK-2, no IRF-5, no TLR-9 e no FcγR2A que segregam fortemente com o fenótipo clínico de lúpus, fazendo supor que sejam polimorfismos com ganho de função, que poderiam ter participação diferencial na patogenia da doença, tornando a célula dendrítica plasmocitóide hiper-reativa a seus ligantes – vírus e imunocomplexos com ácidos nucléicos – hiperproduzindo IFN-α e preparando todo o plantel celular – linfócitos B, T, macrófagos e células dendríticas mielóides – para a auto-reação.

2.1.5 Epigenética e Xenobióticos

A expressão momentânea do DNA em uma célula depende de como esse DNA é acondicionado na cromatina, de como ele é protegido de uma leitura indevida e de como ele desnuda segmentos promotores de transcrição quando a leitura é oportuna. Essa faina de esconder segmentos / expor segmentos é efetivada através de modificações co-valentes da cromatina tais como a metilação do DNA e acetilação de histonas. Em um determinado momento, uma determinada célula só tem em atividade alguns dos seus 30.000 genes: aqueles encarregados da manutenção de processos básicos (“*housekeeping”*) e os genes funcionais específicos da etapa de diferenciação em que a célula se encontra. São os genes “necessários”

para aquela etapa de diferenciação. Todos os outros, “desnecessários”, são mantidos quiescentes graças à metilação de algumas citosinas, preferencialmente aquelas seguidas de uma guanina, os chamados dinucleotídeos CpG (*CpG = Cytosine-phosphate-Guanine*). Em mitose, no momento da duplicação do DNA, a DNA-metil-transferase metila exatamente as citosinas correspondentes a citosinas já metiladas na fita-mãe, o que garante que o padrão de metilação do DNA da célula filha será exatamente igual ao da célula mãe. Chama-se de epigenética a área do conhecimento que estuda essas modificações herdáveis do DNA, que modulam a transcrição, mas não alteraram a seqüência nucleotídica. O foco maior da epigenética é a influência exercida por fatores ambientais – drogas, poluentes, agentes químicos, metais pesados, e outros elementos, que em conjunto são chamados de xenobióticos. É possível que xenobióticos desencadeiem processos epigenéticos como a metilação de DNA e possam provocar a leitura indevida de alguns genes e a repressão indevida de outros e com isso acarretar distúrbios funcionais que resultam clinicamente em câncer, auto-imunidade e outras doenças complexas. Processos epigenéticos podem desnudar segmentos de DNA ricos em CpG, que tem maior capacidade de estimular os TLR e ativar a resposta imune (JANUCHOWSKI R, 2004).

O lúpus pode ser induzido por drogas, como a isoniazida, a procainamida, a hidralazina, e outras. O que ocorre é um típico exemplo de efeito epigenético. A procainamida, antigamente usada como antiarrítmico, é também inibidor competitivo de uma das DNA-metil-transferases, causando um déficit geral de metilação na cromatina, o que provoca no linfócito T a hiperexpressão de vários genes (INF-γ, IL-4, perforina, CD70, CD11a, entre outros), conforme observado *in vitro*, em modelos animais e em pacientes com arritmia (BALLESTAR 2006). A 5-aza-citosina, um análogo da citosina, faz ligação covalente com a DNA-metil-transferase, inibindo-a irreversivelmente. A hidralazina inibe a fosfocinase Ras-MAPK, que sinaliza a expressão da DNA-metil-transferase, acarretando sua

hipoexpressão e não metilação dos promotores de vários genes de linfócitos, que passam a ser hiperexpressos. A molécula LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1), um hetero-dímero de CD11a e CD18, é uma das moléculas hiperexpressas quando a DNA-metil-transferase é inibida. LFA-1 é uma β2-integrina que estabiliza a ligação do receptor T (TCR) com o MHC de classe II de células apresentadoras de antígeno (células dendríticas, linfócito B, macrófago, e outras). Com a hiperexpressão de LFA-1, ocorre uma supra-estabilização da ligação B-T (RICHARDSON 2003), com incentivo à expansão, à ativação bilateral e à produção de anticorpos contra antígenos de baixa afinidade ou até mesmo sem antígeno. A supra-estabilização da ligação linfócito-macrófago resulta na apoptose do macrófago, induzida pela via normal do FAS-Ligante ou por ação da perforina, cujo gene também é desmetilado pelo bloqueio da metil-transferase. Com o excedente apoptótico, no caso de macrófagos, aparecem auto-antígenos nucleares que direcionarão a auto-imunidade tirando proveito da supra-estabilização da ligação B-T. Especula-se que mecanismos elegantes como os descritos acima possam funcionar com outros fármacos e xenobióticos em geral, tanto no lupus como em outros transtornos auto-imunes. Note-se que o lúpus induzido por droga é reversível, com alterações clínicas desaparecendo alguns meses após a retirada da droga, o que reforça a origem epigenética do problema (VASOO S, 2006).

Há uma situação em que um real polimorfismo de DNA se manifesta por via epigenética. A Poli-ADP-Ribose-Polimerase (PARP) é uma enzima reparadora do DNA, situada no braço longo do cromossoma 1 (1q42), lócus fortemente vinculado ao lúpus em estudos familiares de varredura genômica (RUSSELL 2004). Seu produto, a poli-ADP-ribose pode ligar-se à DNA-metil-transferase e inativá-la. Polimorfismos (SNP) com hiperexpressão da PARP no lúpus (HUR 2006) poderiam desencadear mecanismos similares aos desencadeados por drogas como a procainamida, por meio da hipometilação de DNA, hiperexpressão de LFA-1 e perforina (RICHARDSON 2003).

Por outro lado, o efeito de drogas e xenobióticos dependerá também de genes que influenciam a bio-transformação no metabólito final que será responsável pela ação epigenética. No lúpus induzido por propil-tio-uracil o agente ativo é o ácido propil-uracil-sulfônico; no caso da procainamida, a N-hidroxi-procainamida. A primeira etapa do metabolismo dessas drogas é efetuada pelas enzimas do complexo citocromo-oxidase-P450, de localização hepática ou macrofágica. Trata-se de um sistema com diversas iso-enzimas e diversos polimórficos genéticos, que podem estar ligados aos fenótipos do lúpus induzido por droga. O lúpus induzido por fenitoina está associado à CYP1A2; o lúpus induzido por carbamazepina, dapsona e quinidina está associado à CYP2E1; o lúpus associado a aminas aromáticas está associado à CYP1A2. A segunda fase da detoxificação de drogas é a conjugação com moléculas orgânicas (acetilação, glicuronização, etc) para aumentar sua solubilidade e facilitar sua excreção. Importante enzima desta fase é a N-acetil-transferase, que apresenta um polimorfismo de grande penetrância, sendo metade dos indivíduos caucasianos homozigotos para o fenótipo de acetilador lento. Essas pessoas retardam a eliminação de diversas drogas, acarretando maiores níveis e maior incidência de efeitos colaterais, inclusive auto-imunidade. No lúpus induzido por hidralazina, isoniazida, procainamida, dapsona e sulfasalazina o fenótipo do paciente é sempre de acetilador lento (WOOSLEY 1978).

2.1.6 Modulação hormonal

O ambiente hormonal é um fator importante na patogenia lúpica, basta ver a incidência de nove mulheres para um homem, o início das manifestações clínicas após a puberdade e a tendência da doença a piorar na gravidez. Além da influência maior dos esteróides gonadais, a prolactina e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal também têm participação relevante no determinismo nosológico (GRIMALDI 2006).

Raras são as doenças em patologia humana que apresentam um viés de gênero tão alto (BEESON 1994). Admite-se, portanto, que o ambiente estrogênico – ou um outro fator ligado ao sexo ou aos cromossomos X e Y – tenha um papel de alta hierarquia na patogenia do lúpus. Tem sido demonstrados, em pacientes lúpicas, baixos níveis de testosterona e uma tendência a metabolizar estrógenos no sentido da 16α-hidroxi-estrona e estriol, via muito mais feminilizante que a usual no sentido de 2-hidroxi-catecol-estrógenos (LAHITA 1999). Discute-se, porém, se essas peculiaridades têm alguma influência no sistema imune e algum papel geração da doença. Por outro lado, é certo que linfócitos B e T expressam receptores de estrógeno no citoplasma. Observa-se em modelos animais e *in vitro* que sob ação estrogênica ocorre expansão e ativação dos linfócitos da zona marginal, tipo B1, que passam a expressar o gene Bcl-2, dito antiapoptótico, que mantém a população linfocítica em proliferação. Já a prolactina ativa o gene Bcl-2 e o CD40 prolongando a sobrevivência e promovendo ativação, atingindo inclusive a população B *naïve* da zona folicular (GRIMALDI 2005). Por outro lado, com a puberdade ocorre a expressão da molécula CD154 (FAS-Ligante, indutor de apoptose) em linfócitos T (LAMASON 2006), suscitando o ciclo recorrente de expansão B e morte celular, que está no âmago da patogenia lúpica.

Conseqüência ou não dessas expressões gênicas estrógeno-dependentes, admite-se que o lúpus seja uma doença Th2. Observa-se uma tendência à piora clínica durante a gravidez, que por si só já é um período de predomínio Th2. Faz sentido, na gravidez, restringir as ações Th1 para não haver rejeição do implante paterno-fetal, e aumentar as ações Th2 – expansão B e anticorpogênese – para transmitir ao concepto por via transplacentária o máximo de imunidade humoral materna. Não está claro se existem defeitos genéticos primários consistentes nos genes de hormônios e receptores hormonais em populações lúpicas de diversas etnias (WILSON 1996), ou se as alterações hormonais se processam no plano fisiológico, apenas sustentando outros polimorfismos de genes que afetam primariamente a

resposta imune e inflamatória. Esse cenário se estende a hormônios e receptores do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, incluindo o receptor citoplasmático de cortisol (SZYPER-KRAVITZ 2005). A modulação neuro-endócrina da resposta imune justifica a influência que o estresse psíquico pode exercer sobre o desenvolvimento do lúpus e suas futuras exacerbações clínicas (HUERTA 2006).

2.1.7 Susceptibilidade do órgão alvo

As lesões lúpicas em tecidos periféricos – pele, articulações, serosas, rins, glóbulos sangüíneos, neurônios e coagulação – ocorrem por dois mecanismos básicos: deposição de complexos imunes em leitos endoteliais e estruturas peri-vasculares; e anticorpos que reagem diretamente contra célula, tecido ou molécula. Para entender como ocorrerá a eventual patogenicidade de um complexo imune circulante, é necessário entender como o organismo realiza seu manuseio, seu transporte e sua depuração, e que elementos nos sítios distais (endotélio e órgãos-alvo) determinam maior ou menor resposta inflamatória.

Normalmente um complexo imune circula ancorado às hemácias através do receptor de complemento (CR1, CR3), para ser então fagocitado por células do sistema monocítico-macrofágico: quando circulantes, pelas células de Kupffer do fígado e por macrófagos dos sinusóides esplênicos; quando formados no meio extra-vascular, por macrófagos e histiócitos tissulares. A interação do complexo imune com essas células se dá com a interveniência de receptores para o fragmento Fc da imunoglobulina e receptores de complemento. A afinidade entre esses receptores e seus ligantes pode variar, assim como a qualidade do sinal que o receptor envia para o citoplasma, que determina o comportamento da célula, incluindo incremento da função fagocítica, aumento da capacidade oxidativa lisosomial, e produção de citocinas (pró-inflamatórias ou antiinflamatórias, conforme o contexto da ação). O tamanho

do complexo também influencia o processo, com maior facilidade para complexos maiores, como os constituídos por IgM e os “mosaicos” (*lattice*) formados pelo fator reumatóide.

No lúpus eritematoso sistêmico a depuração – ou deposição – dos complexos imunes de IgG com antígenos nucleares atenderá aos requisitos acima. A presença de fator reumatóide, IgM anti-IgG pentamérica e decavalente, diminui o risco de lesão renal, pois favorece a depuração dos complexos imune. Os tipos de receptores de fragmento Fc que determinado leito endotelial apresenta em determinado momento também será importante. Vários genes no braço longo do cromossomo 1 (1q23) codificam diversos receptores Fc, com diferentes afinidades por subclasses de IgG e diferentes capacidades de sinalização citoplasmática. O receptor FcγRIA tem alta afinidade por IgG1 e IgG3 monoméricas. Os receptores FcγRIIA, FcγRIIIA e FcγRIIIB têm baixa afinidade e sinalizam positivamente (estímulo fagocítico-oxidativo, citocinas pró-inflamatórias). O receptor FcγRIIB tem baixa afinidade e sinaliza negativamente, produzindo citocinas antiinflamatórias. Espera-se um equilíbrio de receptores de Fc inibitórios e estimulatórios em macrófagos (inclusive células mesangiais), endotélio e membranas serosas. Polimorfismos genéticos com hipo-expressão física ou funcional de FcγRIIB determinam viés inflamatório; polimorfismos com hiperexpressão física ou funcional de FcγRIIA e FcγRIIIA também determinam viés inflamatório. A hipo-expressão de FcγRIIB é particularmente perversa, pois também causa má resposta inibitória em linfócitos B, atuando como mais um fator de proliferação policlonal, apoptose e anticorpogênese. A presença íntegra do sistema complemento também protege de um desenlace inflamatório, pois a interação do imunocomplexo com o receptor de complemento diminui sua interação com os FcγR de sinalização flogística (JANCAR 2005). No lúpus pode haver um crescendo sintomático, pois havendo atividade inicial e formação de complexos com fixação de complemento, haverá hipocomplementemia de consumo, que potencializará, num ciclo vicioso, o dano inflamatório nos tecidos periféricos.

A susceptibilidade de órgãos-alvo também depende de sua afinidade pela ligação direta do auto-anticorpo, o que corresponde ao mecanismo imunopático do tipo II de Gell e Coombs. No lúpus esse mecanismo explica anemia hemolítica (anticorpo anti-hemácia), a púrpura trombocitopênica (anticorpo antiplaqueta), a leucopenia (anticorpo antileucócito), manifestações neurológicas como psicose lúpica (anticorpos antineurônio) e manifestações trombóticas (anticorpos antifosfolipídio). Esses anticorpos podem ser entendidos com anticorpos contra antígenos nucleares que apresentam reação cruzada contra moléculas de membrana. Vale lembrar que a geração de anticorpos antinucleares passa por um processo de mutação somática e maturação de afinidade, podendo haver pequenos desvios na especificidade original com a possibilidade de reação cruzada contra outros substratos. No caso antifosfolipídio, a linhagem original, natural, era contra fosfolipídios comuns nas bolhas (*blebs*) apoptóticas (FADOK 1992), que passam a cruzar com fosfolipídios que interagem com proteínas do sistema da coagulação. O componente distal da susceptibilidade de órgãos-alvo não é bem estudado, não se sabendo se as proteínas envolvidas são sujeitas a variabilidade genética em populações especificadas ou em pacientes lúpicos individualmente.

2.2 GENE *PDCD1* E A MOLÉCULA PD-1 NA FUNÇÃO IMUNE NORMAL E NO LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

A balança entre ativação e inibição de linfócitos B e T é sujeita a um controle extremamente minucioso, sob pena de haver inflamação excessiva e doença imunopática se predominar ativação, e susceptibilidade à infecção se predominar inibição (WANG 2004). É um equilíbrio sutil que depende do momento, do local, e da natureza da resposta imune. Pode-se, de uma maneira geral, classificar as moléculas que regulam o processo em estimulatórias e

inibitórias, sejam elas receptores de membrana, seus ligantes, sinalizadores citoplasmáticos ou ativadores de transcrição. No LES, a hiperresponsividade de linfócitos B e T, que acentua a capacidade de proliferação e anticorpogênese, é considerada um fator patogenético indispensável. É interessante, portanto, identificar as moléculas regulatórias de linfócitos B e T, e verificar em diferentes etnias se existem alelos polimórficos que possam ser condicionadores independentes da resposta imune exacerbada de pacientes lúpicos.

A molécula PD-1 (*Programed Death*-1) é uma proteína de membrana que, como outras moléculas similares da chamada "família" CD28, tem importante papel na regulação da resposta imune e na tolerância periférica. A molécula CD28, constitutiva em linfócitos T, interage com B7-1 (CD80) ou B7-2 (CD86), presentes na célula apresentadora de antígeno, constituindo o que se convencionou chamar de "co-estímulo", que promove ativação, proliferação e diferenciação do linfócito T, logo após o acoplamento HLA-peptídeo-TCR, o "estímulo" propriamente dito. O sinal citoplasmático de CD28, além da ativação global, induz na membrana celular outras moléculas regulatórias, como CTLA-4 (*cytotoxic T Lymphocyte associated antigen 4*) e PD-1 (*Programed Death-1*), inibitórias, e a molécula ICOS (*Inducible co-stimulant*), estimulatória. Em conjunto, essas moléculas irão balancear a continuidade da resposta no sentido da ativação ou da anergia (KHOURY 2004). No linfócito B, a ativação/inibição é modulada pelas moléculas CD28, PD-1, CD40 e BTLA (*B and T Lymphocyte Atenuator*), acionadas por seus ligantes no linfócito T, quando este reconhece o peptídeo que B lhe apresenta, e ainda pelos receptores do fragmento Fc de complexos imune, especialmente o FcγRIIB, que tem função inibitória (HONDA 2006).

Em 1992 Ishida e colaboradores isolaram o cDNA de uma proteína de membrana induzida em timócitos murinos ativados por anticorpos anti-CD3. Os timócitos estavam em processo de apoptose, daí terem denominado a molécula de *programed cell death-1 (*PD-1). Verificou-se posteriormente que PD-1 não participa exatamente do mecanismo de apoptose,

apenas paralisa a célula no estágio G0-G1, causando anergia e não deleção. Shinohara e colaboradores em 1994 identificaram o gene humano *PDCD1*, localizado no cromossomo 2q37-3. A seqüência de aminoácidos deduzida era 60% idêntica ao correspondente murino. A molécula PD-1 humana tem 55kDa, e, como os demais membros da família CD28 (CD28, CTLA-4, ICOS), apresenta um único domínio IgV-símile em sua porção extracelular. Sua porção citoplasmática possui dois resíduos de tirosina que constituem motivos de regulação inibitória ITIM (*imunorecetor tyrosine-based inibitory motif*) e ITSM (*imunoreceptor tyrosine-base switch motif*). Sua cadeia de aminoácidos tem 33% de homologia com a de CTLA-4, mas, ao contrário desta, que é restrita a linfócitos T, a expressão de PD-1 é induzida em células B, T, células dendríticas e macrófagos. Em resposta a seus ligantes, PD-1 ativa em seu domínio ITSM a fosfatase de tirosina protéica SHP-2 (*SCR homology 2 domain-containing ttyrosine phosphatase 2*), que passa a defosforilar moléculas sinalizadoras citoplasmáticas, entre elas a fosfo-inositol-3-cinase (PI3K) (BARBER 2005), que irão gerar os fatores de transcrição de DNA que promoverão, enfim, a resposta funcional da célula.

Os ligantes de PD-1 são as moléculas PD-L1 e PD-L2, também chamadas de B7-H1 e B7-DC, que foram identificadas em base de dados genômicos por sua semelhança com B7-1 e B7-2. As moléculas PD-L1 e PD-L2 são proteínas transmembrana com domínios IgV-símile e IgC-símile na região extracelular. PD-1 é constitutivamente expressa em linfócitos T, linfócitos B, macrófagos e células dendríticas, com aumento de expressão após ativação dessas células (NISHIMURA 2001). A expressão de PD-L1 também é detectada em células não-linfóides, como, por exemplo, células endoteliais, do coração, pulmões células β das ilhotas de Langherans do pâncreas, células da glia no parênquima cerebral, e células musculares. Por sua vez, a expressão de PD-L2 é mais limitada, observada apenas em macrófagos ativados e células dendríticas (LATCHMAN 2001). Ambas PD-L1 e PD-L2 podem ser expressas em células cancerosas de várias origens, incluindo ovário, esôfago, rim e

cérebro (OKAZAKI 2006). Desta forma, considera-se que a via PD-1/PD-L1 tenha uma abrangência muito maior que as vias que envolvem CD28, CTLA-4 e PD-L2, com um papel adicional e importante na tolerância imunológica em tecidos periféricos.

Associação da molécula PD-1 com auto-imunidade começou com a observação de que camundongos C57BL/6 com deleção (*knock-out*) do gene *PDCD-1* apresentavam artrite e glomerulonefrite com depósito de IgG3 e C3, lembrando o lúpus eritematoso sistêmico (NISHIMURA 1999) e que camundongos BALB/c *PDCD* $^{-/-}$ desenvolviam miocardiopatia dilatada com anticorpos antitroponina cardíaca (OKAZAKI 2003).

O importante papel da via PD-1/PD-L1 na tolerância imunológica em tecidos periféricos foi revelado em camundongos NOD (*non obese diabetic*), que desenvolvem insulite auto-imune e diabetes na idade adulta (ANSARI 2003). Na fase pré-clinica, a molécula PD-1 é expressa com intensidade nas células β das ilhotas de Langherans, e linfócitos T se acumulam em seu redor, sem haver, entretanto, invasão e destruição das ilhotas. Em animais NOD *knock-out* para PD-1 (*PDCD* $^{-/-}$), a insulite destrutiva e diabetes ocorre mais precocemente, com apenas quatro semanas de vida (WANG 2005). Além disso, anticorpos monoclonais bloqueadores contra PD-1 ou PD-L1 acarretam imediata invasão e destruição das ilhotas, sugerindo que PD-L1 estaria funcionando como uma barreira ou uma blindagem contra células T efetoras. A via PD-1-PD-L1 atua também na regulação da encefalite auto-imune experimental (SALAMA 2003).

Esse efeito de blindagem também ocorre na placenta (PETROFF 2003), onde moléculas PD-L1 se expressam com intensidade e linfócitos T ficam contidos fora da área trofoblástica. Linhagens não singênicas de camundongos (B6 cruzadas com CBA) são propensas a aborto, que ocorre com o uso de anticorpos monoclonais contra PD-L1, que induz à invasão da placenta por células T e a interrupção da gravidez (GULERIA 2005). Especula-

se se a via PD-1/PD-L1 também seja o instrumento de manutenção do chamado "privilégio imunológico", próprio de órgãos como o olho, o cérebro e as gônadas.

Alguns tecidos neoplásicos apresentam hiperexpressão de moléculas PD-L1 e PD-L2 como mecanismo de escape contra as células T $CD8^+$ com atividade antitumoral (DONG 2002). Modelos de crescimento tumoral demonstram que a erradicação do tumor pode ocorrer com anticorpos monoclonais bloqueadores (IWAI 2002) de PD-L1 ou PD-L2, com isoforma solúvel de PD-1, ou exposição a linfócitos *PDCD-1*$^{-/-}$. No plano clínico, tem sido observado que alta expressão de PD-L1 nos tumores correlaciona-se diretamente com taxa de mortalidade, como observado em casos de carcinoma de células renais e carcinoma de esôfago, e também com a capacidade de metastatização, como observado em casos de melanoma e câncer de colon.

Também alguns patógenos desenvolveram mecanismos de escape às defesas imunológicas por meio da indução de PD-L1 nas células parasitadas, como é o caso do rinovirus humano (*HRV*) (KIRCHBERGER 2005), do *Schistossoma mansoni* (SMITH 2004), e do vírus da coriomeningite linfocítica de murinos (BARBER 2006). As células parasitadas inativam os linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ pela da ação de PD-L1 hiperexpressa, configurando mais uma vez o efeito de blindagem imune.

Em conclusão, a molécula PD-1 parece ter o papel fisiológico de frear a resposta imunológica e evitar reações imunes exageradas e indesejadas, através da limitação da ativação do linfócito T em centro germinativo, e pela da proteção de tecidos não linfóides periféricos ao dano potencial provocado por células T efetoras.

O gene *PDCD-1* foi estudado por Finger e colaboradores (1997), que amplificaram e seqüenciaram o cDNA e o DNA genômico, e estabeleceram a estrutura organizacional do gene, identificando exons, introns, regiões promotoras e 3'UTR (Figura 2). Desde então, até julho de 2006 (www.NBCI 2006), 35 polimorfismos genéticos do tipo SNP já foram descritos

do site do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI, 2006), assim como foram identificados sítios intrônicos de ligação de fatores de transcrição, como RUNX-1, NFκB e E-box.

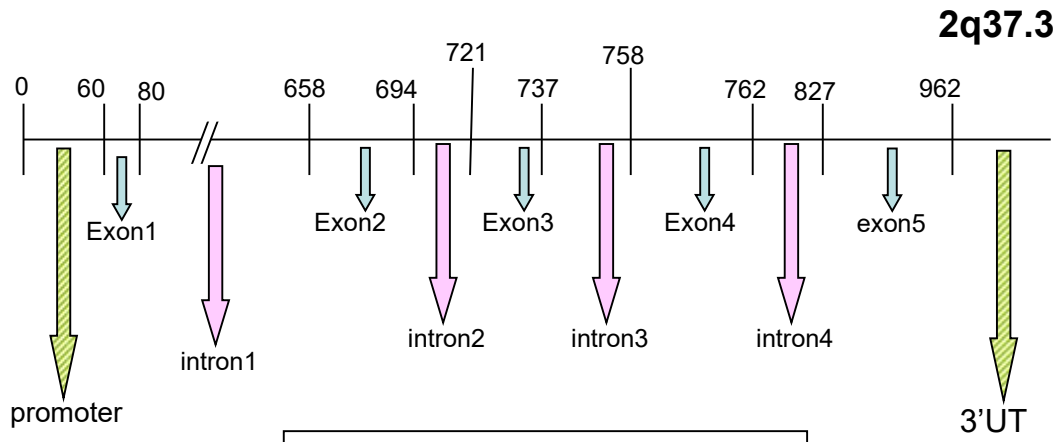

Figura 2: estrutura do gene *PDCD-1*

O RNA mensageiro do gene *PDCD1* passa por um processo de clivagem (*splicing*) no citoplasma de células mononucleares ativadas do sangue humano (NIELSEN 2005), gerando diferentes transcrições protéicas, conforme mostrado na figura 3. A forma com leitura completa (*full lengh – flPD1*) é fisiológica e funcional. A variante PD1Δex3 exclui o exon 3, que codifica a porção transmembrana, gerando uma proteína solúvel que sendo secretada poderá bloquear os ligantes PD-L1 e PD-L2, com potencial imunomodulador apreciável. A molécula CTLA-4 também apresenta uma variante de clivagem sem a porção transmembrana, secretada e solúvel (sCTLA-4), com atividade bloqueadora sobre ligantes fisiológicos. Expressão aumentada de sCTLA-4 foi observada em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LIU 2003).

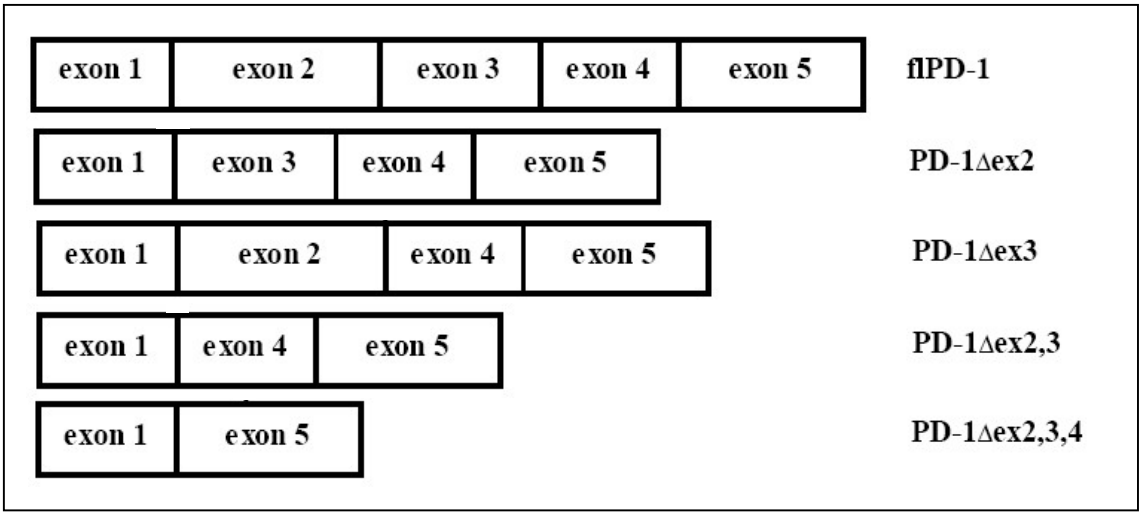

Figura 3. Representação esquemática da organização de exons em diferentes variantes de clivagem (*splicing*) de PD-1

A real contribuição da hipoexpressão de PD-1 para auto-imunidade humana está sendo aos poucos descortinada. Estudos de varredura genômica (*wide genoma screening*) em famílias com múltiplos casos de LES apontam o braço longo do cromossomo 2 (2q-35-37) como uma região que apresenta significativa ligação (*linkage*) com o LES (GAFFNEY 2000). Nesse segmento, o gene *PDCD-1* é o que apresenta maior aptidão a gene-candidato, devido a seu papel regulatório na resposta imune e aos resultados preliminares em modelos animais. Desta forma, estudos de associação de PD-1com LES (PROKUNINA 2002), diabetes melitus (NIELSEN 2003), esclerose múltipla (KRONER 2005) e artrite reumatóide (KONG 2005) indicam a possibilidade de *PDCD-1* atuar como um gene condicionante comum a várias doenças auto-imunes (RODRIGUEZ-REYNA 2006).

Prokunina e colaboradores (2002) amplificaram e seqüenciaram a total extensão do DNA genômico de *PDCD-1*, incluindo as regiões promotoras e 3'UTR (*untraslated tandem repeats*), em cinco pacientes lúpicos e cinco controles sadios, sem parentesco entre si, e observaram sete SNP, que foram denominados PD-1.1, PD-1.2, PD-1.3, PD-1.4, PD-1.9, PD-

1.5 e PD-1.6, segregados em estudos populacionais em cinco haplótipos diferentes, conforme ilustrado na figura 2.

O haplótipo 1, diferenciado dos outros pela substituição de guanina por adenina na posição 7146 do íntron 4, apresentou associação significativa com LES em 30 famílias nórdicas com múltiplos casos (LES=25%, controles=5%, p=0,0009), em 266 lúpicos suecos (LES=11%, controles=4%, p=0,005), em 151 famílias multi-casos euro-americanas (LES=11%, controles=5%, p=0,01), em 431 lúpicos mexicanos (LES=7%, controles=2%, p=0,0009), mas apresentou prevalência muito baixa em 82 famílias multi-casos afro-americanas não permitindo avaliar associação com lúpus (LES=3%, controles=0%).

O íntron 4 de *PDCD-1* comporta 11 sítios hipotéticos (inferidos pela seqüência nucleotídica) de ligação dos fatores de transcrição RUNX-1, NFκB e E-box, sendo que a posição 7146 faz parte de em um sítio de ligação do RUNX-1. Prokunina e colaboradores (2002) demonstraram que esse segmento hibridiza com extratos nucleares de células T Jurkat, e que anticorpos anti-RUNX-1 bloqueiam essa hibridização. Especula-se, portanto, que esse polimorfismo acarrete hipoexpressão de PD-1, e todas as conseqüências imuno-regulatórias inerentes. O fator RUNX-1 tem sido vinculado à patogenia de outras doenças auto-imunes, como a psoriase e a artrite reumatóide (ALARCON-RIQUELME 2003). Estudo quantitativo de expressão do RNA mensageiro de *PDCD-1* em 30 mulheres 7146-AA (13 lúpicas com doença inativa e 17 controles sadias) mostrou expressão diferenciada com relação ao genótipo GG, mas sem poder conclusivo devido a grande variabilidade interpessoal (PROKUNINA 2002).

Haplótipos	PD-1.1	PD-1.2	PD-1.3	PD-1.4	PD-1.9	PD-1.5	PD-1.6	% LES	% Controles
	Promot	Intron2	Intron4	Intron4	Exon5	Exon5	3'UTR		
	-531AG	6438AG	7146GA	7499GA	7625CT	7785AG	8738AG		
					ALA>VAL	ALA>ALA			
1	A	A	**A**	G	C	A	A	**25**	**05**
2	A	A	G	G	C	A	A	36	48
3	A	A	G	A	C	A	A	28	27
4	A	A	G	A	C	G	G	06	19
5	G	G	G	G	T	G	G	05	02

Quadro 1 - Cinco haplótipos com 7 SNPs em famílias escandinavas, e respectivas prevalências em pacientes lúpicos e em controles sadios. Apenas o haplótipo 1 diferiu entre lúpicos e controles, e apenas o SNP PD1-3 (posição 7146) é exclusivo deste haplótipo. Adaptado de Prokunina L, 2002.

A prevalência – alta em euro-descendentes, média em euro-miscigenados (mexicanos), baixa em afro-descendentes, e zero em chineses (LIN 2004) – sugere que a mutação original do SNP 7146(G>A) seja de data recente, tendo aparecido em fluxos migratórios humanos por ocasião do povoamento do continente europeu.

Estudo de associação dos polimorfismos de *PDCD-1* com LES em populações da Espanha revelou resultados surpreendentes (FERREIROS-VIDAL 2004). Contrastando com os achados em suecos, euro-americanos e mexicanos, o alelo 7146A ocorreu em alto percentual em 1598 controles espanhóis (12,9%) e em menor percentual em 1032 lúpicos (9,4%), com taxas similares em diversas cidades (Santiago: 13,3% [LES] x 7,2% [controles]; Madri: 12,8% x 6,9%; Sevilha: 16,2% x 10,6%; Granada: 10,3% x 8,8%; Barcelona: 16,2 x 10,7%). Esses achados comprovaram uma associação estatisticamente positiva do alelo G

com LES, exatamente o oposto ao observado por Prokunina (2002). No caso espanhol, o alelo A não teria um efeito de favorecimento, mas de proteção contra o LES. Os autores interpretam o resultado como indicativo que o gene *PDCD-1* estaria realmente associado ao LES, não através do SNP na posição 7146, mas através de outro SNP ou outra alteração genômica em desequilíbrio de ligação com 7146. Vale lembrar que a identificação dos sete SNPs em *PDCD-1* foi feita pelo seqüenciamento de apenas dez indivíduos, cinco lúpicos e cinco normais, já havendo 35 polimorfismos descritos no site do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI, 2006) até julho de 2006. A recomendação final dos autores foi no sentido de pesquisar de maneira mais exaustiva os possíveis SNPs de *PDCD-1*, e executar estudos de associação de *PDCD-1* com LES em outras populações, de diferentes etnias (FERREIROS-VIDAL 2004).

Johansson e colaboradores (2005), trabalhando com 260 lúpicos e 630 controles em população etnicamente uniforme do norte da Suécia, observaram a associação do alelo A de PD-1-3 com acometimento renal no lúpus, com OD=3.54 (IC95% 1,56-8,01), mas sem associação para a susceptibilidade ao LES. Nielsen e colaboradores (2004) descreveram um novo polimorfismo intrônico, na posição 6867C/G de *PDCD1*, que se associava significativamente com nefrite lúpica. A posição 6867 é um hipotético sítio de ligação do repressor de transcrição ZEB, o que faz supor que o polimorfismo possa causar hipo-expressão de PD-1 e conseqüências imunopatogenéticas.

3. METODOLOGIA

3.1 OBJETIVOS

3.1.1 Geral

- Avaliar a associação do polimorfismo G>A na posição 7146 do intron 4 do gene *PDCD1* à ocorrência de lúpus eritematoso sistêmico em pacientes da Amazônia.

3.1.2 Específicos

- Verificar a **freqüência dos alelos G e A** na posição 7146 do íntron 4 do gene *PDCD1*, em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico, residentes na região Amazônica e em um grupo controle de pessoas sadias, oriundas da mesma região.
- Verificar a **freqüência dos genótipos GG, AG** e **AA** referentes à posição 7146 do íntron 4 do gene *PDCD1*, em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico, residentes na região Amazônica e em um grupo controle de pessoas sadias oriundas da mesma região.
- Verificar se as freqüências alélica e genotípica do polimorfismo 7146G>A do gene *PDCD1* se correlacionam com subtipos da doença e outras variáveis demográficas, em pacientes lúpicos residentes na região Amazônica.

3.1.3 Delineamento da pesquisa

- Estudo retrospectivo, de casos e controles, sendo o diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico o **desenlace** final**,** já configurado no grupo de casos, e a presença do alelo A na posição 7146 do gene *PDCD1* no cromossomo 2q.37.3, o **fator de risco** investigado em casos e controles,.

3.1.4 Hipótese de nulidade

- As freqüências de alelos (A e G) e de genótipos (AA, AG e GG) do polimorfismo 7146G>A do gene *PDCD1* **são iguais** em portadores de lúpus eritematoso sistêmicos e em indivíduos do grupo controle, ambos oriundos da região Amazônica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA NA PESQUISA

4.1.1. Aprovação pelo comitê de ética na pesquisa

O presente trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética na Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas, com aprovação em reunião plenária de 22/09/2005. O "Termo de Consentimento Livre Esclarecido" (ANEXO 1), segundo resolução 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Educação, Brasília, DF, Brasil, foi assinado por todos os participantes ou responsáveis após terem sido informados sobre os objetivos da pesquisa. Aos que não possuíam capacidade de leitura ou que não compreenderam os termos, o conteúdo do documento foi lido e explicado, enfatizado que poderiam sair da pesquisa a qualquer momento e que isso não lhes traria nenhum prejuízo físico ou moral, estando garantida a continuidade do seu tratamento. Ficou esclarecido que as amostras de DNA serão exclusivas para estudos de genética do lúpus eritematoso sistêmico, no âmbito da Universidade Federal do Amazonas, com a identificação das amostras sendo feita sempre por meio de códigos garantido sigilo e anonimato dos participantes.

4.1.2 Formação dos grupos de casos e controles

O trabalho foi desenvolvido no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário Getúlio Vargas, da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus, Amazonas,

Brasil, com as coletas de material biológico, informações clínicas e epidemiológicas, realizadas no período entre dezembro de 2005 a abril de 2007.

O grupo de casos foi constituído por pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico, com preenchimento de pelo menos quatro dos onze critérios classificatórios publicados em 1982 pelo American College of Rheumatology (ACR) (TAN 1982), modificados em 1998, quais sejam: 1- fotossensibilidade; 2 – erupção (*rash*) malar; 3 – erupção (*rash*) discóide; 4 – úlcera oral; 5 – artrite; 6- serosite; 7 – nefrite; 8 – acometimento hematológico (anemia hemolítica ou trombocitopenia ou leucopenia); 9 – acometimento neurológico (psicose ou convulsão); 10 – presença de anticorpos antinucleares em teste de imunofluorescência indireta em substrato de células HEpII (Fator Antinuclear ou FAN); 11 – critério imunológico (anticorpos anti-DNA ou anti-Sm ou anti-cardiolipina). A inclusão foi seqüencial, não tendo havido nenhuma recusa dos pacientes em participar do trabalho. Não houve exclusão por sexo, idade, tipo de manifestação ou grau de atividade da doença. A busca por pacientes deu-se apenas no Serviço de Reumatologia, não tendo havido busca de casos em ambulatórios de Dermatologia, Nefrologia ou Serviço de Hemodiálise. Dados demográficos, epidemiológicos e nosológicos foram apurados no prontuário da Instituição e por entrevista direta com o paciente, gerando o preenchimento de um formulário próprio, constante no ANEXO 2. As características clínicas do lúpus foram conceituadas conforme as definições do American College of Rheumatology (ACR). Dentro da categoria “acometimento renal” consideramos a subcategoria “acometimento renal grave” naqueles pacientes com biópsia renal tipo IV ou V da classivicação da Organização Mundial de Saúde (OMS), os pacientes que se submeteram ao tratamento com ciclofosfamida ou os pacientes admitidos a programas de hemodiálise ou transplante renal. Foram incluídos na categoria “trombose” os pacientes que apresentaram pelo menos uma vez episódio de trombose venosa profunda (TVP) em

membros ou território esplâncnico, ou episódios de obstrução arterial com expressão externa (gangrena) ou visceral ou em sistema nervoso central (AVC ou mielopatia).

Os dados de procedência geográfica foram investigados segundo o local de nascimento por três gerações (paciente, pais e avós), sendo então classificados em 4 categorias: com três gerações (índex, pais e avós) nascidas na Amazônia (AM3), com duas gerações (índex e pais) nascidas na Amazônia (AM2), com apenas o paciente nascido na Amazônia (AM1) e paciente nascido fora da Amazônia (AM0). Considerou-se "Amazônia" os Estados brasileiros do Amazonas, Acre, Roraima, Rondônia, Pará, Amapá e Tocantins, além dos países vizinhos Peru, Colômbia, Venezuela e Guiana, Guiana Francesa e Suriname. Os registros do ítem "raça e/ou cor da pele" foram efetuados de acordo com a autodefinição por parte do próprio paciente seguindo as categorias adotadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e Ministério da Saúde do Brasil, que são: "branca", "negra", "parda", "amarela" e "indígena" (sic).

O grupo controle foi constituído de pessoas sadias, sem evidências clínicas atuais ou pretéritas de sinais ou sintomas de lúpus eritematoso sistêmico, sem relação de parentesco entre si e sem relação de parentesco com pacientes lúpicos. Tentou-se parear o grupo controle com o grupo caso por sexo, faixa etária e procedência. Como o LES é um fenótipo tardio, admitiu-se a inclusão de mulheres com idade superior à esperada no grupo teste. O grupo controle foi composto com profissionais hospitalares e universitários, além de comunitários vizinhos e conhecidos de pacientes lúpicos. Às pessoas convidadas foi feita uma explanação sobre as finalidades do trabalho, os riscos na participação e o sigilo com relação aos dados clínicos e moleculares. Após, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado e, colhida amostra de 5 mL de sangue venoso em veia periférica. Uma entrevista foi feita com o objetivo de registrar quaisquer doenças prévias, sintomas compatíveis com lúpus e outras doenças auto-imunes, e história familiar de lúpus ou de outra doença auto-imune, conforme

formulário mostrado no ANEXO 2. Os dados de procedência geográfica e de raça ou cor foram investigados por 3 gerações (paciente, pais e avós) com uso de categorias idênticas às adotadas para o grupo de casos. Os registros sobre raça/cor foram efetuados de acordo com autodefinição por parte do próprio indivíduo controle em categorias idênticas às adotadas para o grupo de casos.

4.1.3 Extração do DNA

A extração do DNA genômico dos pacientes lúpicos e indivíduos controle foi feita a partir da amostra de 5 mL de sangue venoso colhido com EDTA, utilizando a técnica de sais de brometo de tetrametilamônio - DTAB/CTAB descrita por Gustincich e colaboradores (1991) com algumas adequações. A técnica consistiu na retirada de aproximadamente 0,5 mL de amostra com a camada de leucócitos "*buffy coat*" obtida a partir do repouso do sangue por 24 horas a 4º C. As amostras foram acondicionadas em microtubos de polipropileno de 2 mL e misturadas com um volume igual (0,5 mL) de tampão de lise: DTAB (dodecyl-trimethyl-ammonium bromide, Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) a 12%, NaCl 2,25 M, Tris 150 mM pH 8,6 e EDTA 75 mM, centrifugadas por sete segundos e incubadas por 10 minutos a temperatura de 68 a 70ºC. Após esta etapa, foi adicionado 800µL de clorofórmio em cada tubo, e imediatamente submetido a vigorosa agitação. Após centrifugação a 10.000 x *g* por 2 minutos, a fase superior do sobrenadante de cada tubo foi transferida para dois novos microtubos de 2 mL, que continham 1,0 mL de CTAB (hexadecyl-trimethyl-ammonium, Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) a 0,5% com NaCl 0,4 M. Em seguida a mistura foi lentamente homogeneizada para se obter o precipitado – DNA/CTAB. Após nova centrifugação a 10.000 x *g* por dois minutos, o precipitado (DNA) foi ressuspenso em 300 µL

de cloreto de sódio 1,2 M e 750 µL de etanol absoluto e centrifugado por mais três minutos a 13.000 x *g*. As duas lavagens finais foram realizadas com etanol a 70% e centrifugadas por três minutos. O sobrenadante foi desprezado e o DNA foi posteriormente dissolvido em 100-200 µL de H_2O. O DNA extraído foi armazenado a 20ºC negativos em microtubos de polipropileno de 0,6 mL e identificados por código.

4.1.4 Quantificação do DNA extraído

As amostras de DNA obtidas de ambos os grupos foram quantificadas em espectrofotômetro de luz ultravioleta (GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator – Amersham Biosciences, Pittsburgh, Estados Unidos.) e diluídas para 50 ng/µL para uso na PCR.

4.1.5 Amplificação do DNA e identificação do alelo polimórfico

A amplificação do DNA genômico e identificação do polimorfismo G/A7146 no gene *PDCD1* foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*) e polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP – *restriction fragment lenght polymorphism*), com um protocolo modificado de (SANGHERA 2004). Uma seqüência de 180 pares de base (pb) foi amplificada com os *primers* 5'-CCC CAG GCA GCA ACC TCA AT-3', e 5'-GAC CGC AGG CAG GCA CAT AT-3', sintetizados pela Alpha DNA (Montreal, Canadá). O DNA genômico (300 ng) foi submetido à amplificação com 0,3 µM de cada *primer*, 200 µM de dNTP, (Invitrogen, Carlsbad - Estados Unidos), 2,5 µL de

tampão de PCR 10x (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl), 1,5 mM $MgCl_2$, 1U Taq DNA Polymerase, (Invitrogen, São Paulo – Brasil), em um volume final de 25 µL. O DNA foi amplificado em termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster – Estados Unidos). Os parâmetros consistiram de desnaturação inicial por cinco minutos a 95ºC, 35 ciclos de: 15s a 94ºC (desnaturação), 30s a 60ºC (anelamento) e 15s a 72ºC (extensão), e uma extensão final a 72ºC por 7 minutos. Na figura 2 é apresentada a seqüência nucleotídica adjacente ao polimorfismo *PDCD1*, com indicação da posição 7146 onde há a mutação G/A, local de clivagem de *Pst*-1. Os pontos de hibridização são destacados, na figura.

C<u>CACCTCCCCAG</u>CCCCCAGGCAGCAACCTCAATCCCTAAAGCCATGATCT
GGGGCCCCAGCCCACCTGC**g/a**GTCTCCGGGGGTGCCCGGCCCATGTGTGT
GCCTGCCTGCGGTCTCCAGGGGTGCCTGGCCCACGCGTGTGCCCGCCTGC
GGTCTCTGGGGGTGCCCGGCCCACATATGTGCCTGCCTGCGG<u>TCTCCAGGT</u>
GTGCCCGGCCCATGCGTGTG

Figura 5 - Seqüência nucleotídica adjacente à posição 7146 no intron 4 do gene *PDCD1*, com polimorfismo g/a em destaque em negrito, e os sitios de hibridização dos primers sublinhados.

O polimorfismo G/A foi detectado por digestão do produto de amplificação da PCR com a enzima *Pst* I (Jena Bioscience, Jena - Alemanha). Um volume de 10 µL do produto de PCR foi submetido à digestão com 10U de enzima *Pst* I e tampão da enzima (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 10 mM $MgCl_2$; 1 mM ditiotreitol; 100 µg/mL BSA) em um volume final de 20 µL. A reação foi incubada a 37ºC por 12 horas (*overnight*).

O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 4%, em cuba horizontal (BioAgency, São Paulo – Brasil), dimensão do gel 15 x 12,8 x 0,5 cm (comprimento, largura, espessura, respectivamente), com os parâmetros eletroforéticos: 120 volts, 100 mili-ampéres por 45 minutos. Posteriormente, o gel de agarose foi corado com

brometo de etídeo, visualizado em um transiluminador ultravioleta e foto documentado no sistema Eagle Eye II (Stratagene, Cedar Creek, Estados Unidos).

Para interpretação dos resultados da eletroforese, as amostras com um único fragmento de 180 pb foram classificadas como G/G, amostras com fragmentos de 180, 123 e 57 pb foram classificadas como G/A e amostras com fragmentos de 123 e 57 pb foram classificadas como A/A.

5. RESULTADOS

No processo de amplificação e digestão com a enzima de restrição *Pst*-1, obtivemos fragmentos de 200 pares de base (pb) correspondentes ao genótipo GG, fragmentos de 200, 123 e 57 pb correspondentes ao alelo GA e fragmentos de 123 e 57 pb correspondentes ao genotipo AA, conforme apresentado na figura 1.

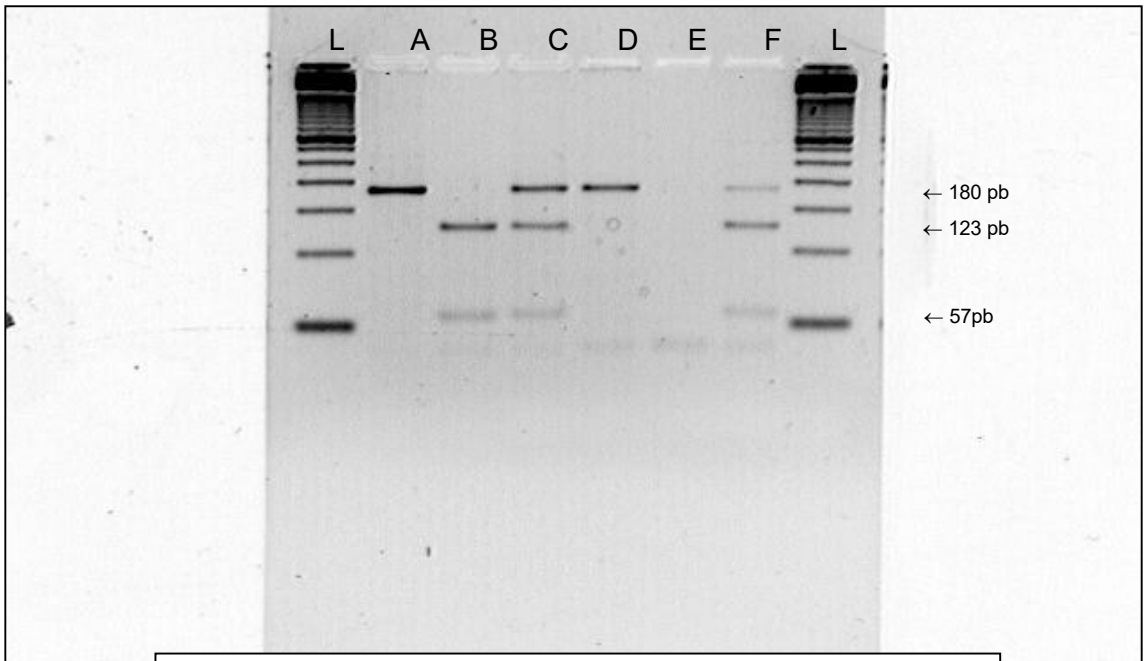

Figura 6 – Gel de agarose a 4% com o produto da digestão pela enzima *Pst* I do segmento de DNA amplificado do gene *PCDC1*. A enzima cliva o alelo com adenina na posição 7146. Linhas "A" e "D" são genótipos GG com fragmento de 180 pb; linha "B" é genótipo AA com fragmentos de 123 e 57pb; linha "C" e "F" é genótipo GA, com fragmentos de 180, 123 e 57 pb. Linha "E" é controle negativo e "L" são *ladders* de 50 pb.

O grupo de casos foi composto de 207 pacientes com quatro ou mais critérios do American College of Rheumatology para o diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico e o grupo controle foi composto de 202 indivíduos sadios, pareados por sexo, idade e procedência geográfica. No grupo de casos, 191 eram do sexo feminino e 16 do sexo masculino, configurando respectivamente 92,3% e 7,7% dos casos. No grupo controle havia 192

indivíduos do sexo feminino e 10 do sexo masculino, configurando respectivamente 95,0% e 5,0% dos controles. A média das idades foi de 34,22 ± 11,83 anos no grupo de casos e 40,36 ± 19,48 anos no grupo controle. Quanto ao local de nascimento do caso índex, pais e avós, no grupo de casos 176 (85,0%) forneceram informações, sendo 112 (63,6%) com três gerações nascidas na Amazônia, 39 (22,2%) com duas gerações nascidas na Amazônia, 22 (12,5%) só o paciente nascido na Amazônia e em três casos (1,7%) o paciente não era nascido na Amazônia. No grupo controle, 195 (96,5%) informaram a procedência. Havia 102 (52,3%) com três gerações nascidas na Amazônia, 47 (24,1%) com duas gerações nascidas na Amazônia, em 28 (14,6%) ocorrências apenas o indivíduo controle nasceu na Amazônia, e em 18 (9,2%) ocorrências o indivíduo controle não nasceu na Amazônia. Com relação à cor auto-definida da pele, 178 (85,9%) indivíduos no grupo de casos e 185 (91,5%) no grupo controle forneceram informações. No grupo casos, 45 (25,3%) definiram-se como brancos, dois (1,1%) definiram-se como negros, 130 (73,0%) definiram-se como pardos, um (0,6%) definiu-se como indígena e nenhum definiu-se como "amarelo" *sic*. No grupo controle 50 (27,0%) indivíduos definiram-se como brancos, 13 (7,0%) como negros, 118 (63,%) como pardos, quatro (2,2,0%) como indígenas e nenhum definiu-se como "amarelo" *sic*. Na tabela 1 é apresentada a composição desses grupos com relação a variáveis demográficas descritas acima. Observa-se que houve diferença com significância estatística entre casos e controles no item procedência com três gerações amazônidas, cor branca e cor parda.

Característica demográfica	Grupo Casos	Grupo Controles	*"p"*
Número de Participantes	207	202	
Sexo Feminino Sexo Masculino	191 (92,3%) 16 (7.7%)	192 (95;0%) 10 (5,0%)	0,34 0,34
Média de idade	34,22 ± 11,83	40,36 ± 19,48	<0,001
3 geração amazônidas 2 geração amazônidas 1 geração amazônidas Não amazônida	112/176 (63,6%) 39/176 (22,2%) 22/176 (12,5%) 3/176 (1,7%)	102/195 (52,3%) 47/195 (24,1%) 28/195 (14,6%) 18/195 (9,2%)	**0,0357** 0,7491 0.7104 **0,0036**
"branco" "negro" "pardo" "indígena" "amarelo" (sic)	45/178 (25,3%) 2/178 (1,1%) 130/178 (73,0%) 1/178 (0,6%) 0/178	50/185 (27,0%) 13/185 (7,0%) 118/185 (63,%) 4/185 (2,2,0%) 0/185	0,7957 0,0140 0.0749 0,3912

Tabela 1 – Composição demográfica de casos e controles, com quantificação por sexo, idade, procedência e cor autodefinida.

A freqüência do alelo G na posição 7146 do gene *PDCD1* foi de 91.8% no grupo de casos e de 93,1% no grupo controle. Correspondentemente, a freqüência do alelo A foi de 8,2% no grupo de casos e de 6,9% no grupo controle.Os genótipos GG, GA e AA no grupo de casos foram 85,5%, 12,6% e 1,9% e, respectivamente, 87,1%, 11,9% e 1,0 % no grupo controle. Os carreadores do alelo G, isto é, indivíduos GG e GA foram 98,0% no grupo de casos e 99,0% no grupo controle. Os carreadores do alelo A, isto é, indivíduos AA e GA foram 14,5% no grupo de casos e 12,9% no grupo controle. Não houve diferença significante estatisticamente (p>0,05) quanto à freqüência alélica, às freqüências genotípicas e a freqüência de carreadores entre os dois grupos. Esses dados estão resumidos na Tabela 2.

Genotipagem	Grupo Casos (n=207)	Grupo Controles (n=202)	*"p"*
Alelo G Alelo A	91,8% (380/414) 8,2% (34/414)	93,1% (376/404) 6,9% (28/404)	0,5752 0,5752
Genótipo GG Genótipo GA Genótipo AA	85,5% (177/207) 12,6% (26/207) 1,9% (4/207)	87,1% (176/202) 11,9% (24/202) 1,0% (2/202)	0,7391 0,9532 0,7031
Carreadores do alelo G Carreadores do alelo A	203 (98,0%) 30 (14,5%)	200 (99,0%) 26 (12,9%)	0,7031 0,7391

Tabela 2 – Freqüências alélica, genotípica e de carreadores do alelo A e G do polimorfismo da posição 7146 do gene *PDCD1* em indivíduos casos e controles.

No grupo de casos e no grupo controle as freqüências genotípicas esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg não diferem estatisticamente das freqüências genotípicas de fato observadas. As duas populações respeitam, portanto, o equilíbrio de Hardy-Weinberg, presumindo-se pan-mixia.

Na Tabela 3 são apresentadas as distribuições dos alelos G e A em casos e controles com estratificação por características demográficas. Observa-se que a freqüência de A não variou entre casos e controles considerando-se apenas o sexo feminino ou masculino. Também não ocorreu variação entre casos e controles considerando-se respectivos locais de nascimento por três gerações. A freqüência do alelo A também não variou entre casos e controles considerando-se a cor da pele autodefinida. Na tabela 3 são apresentados os valores da freqüência do alelo A em casos e controles nessas categorias demográficas.

Características demográficas	Número Encontrado		Freqüência do alelo A		*p*
	casos (*n*)	controles (*n*)	casos (*n*)	controles (*n*)	
Total	207	202			
Sexo Feminino	191	192	7,7 %	6,7 %	0,6623
Sexo Masculino	16	10	6,2 %	5,0 %	1,000
Total	176	195			
3 gerações amazônidas	112	102	8,4 %	7,3 %	0,8006
2 gerações amazônidas	39	47	14,1%	8,5 %	0,3574
1 gerações amazônidas	22	28	0,0 %	1,7 %	-
Não amazônida	3	18	0,0 %	8,3 %	-
Total	178	185			
Cor “branca”	45	50	8,8 %	7,0 %	0,8316
Cor “negra”	2	13	0 %	15,3 %	-
Cor “parda”	130	118	8,4 %	6,3 %	0,4714
Cor “indígena”	1	4	0 %	12,5 %	-
Cor “amarela”	0	0	0	0	-

Tabela 3 – Freqüência do alelo A no grupo de casos e no grupo controle, conforme categorias demográficas sexo, procedência e cor da pele autodefinida.

O grupo de casos foi estratificado conforme características descritivas da doença, para análise da freqüência do alelo A. Para efeitos de comparação e avaliação de significância estatística, o termo de referência foi a freqüência alélica de A no grupo controle (6,9%). Nos 45 pacientes com LES de início na faixa pediátrica (até 18 anos) a freqüência de A foi 10,0%. Na faixa de adulto jovem (18 a 36 anos) foi de 6,6% e no lúpus da maturidade (mais que 36 anos) foi 10,0%. Nos pacientes que apresentavam quatro ou cinco critérios do American College of Rheumatology (ACR) a freqüência de A foi 7,7%, nos pacientes com seis ou sete critérios a freqüência de A foi 8,4% e nos pacientes com oito ou mais critérios a freqüência de A foi 15,6%. Com relação aos critérios do ACR vistos individualmente, a freqüência de A nos pacientes foi de: 8,1% para fotossensibilidade; 7,6% para erupção malar; 10,5% para erupção discóide; 6,2% para úlcera oral; 7,8% para artrite; 8,6% para acometimento renal; 5,3% para o acometimento renal grave; 9,3% para o acometimento hematológico; 9,3 para anemia

hemolítica; 9,5% para trombocitopenia; 10,2% para leucopenia; 12% para serosite; e 7,5% para o acometimento neurológico. Com relação à comorbidade e antecedentes familiares, nos pacientes com fenômenos trombóticos a freqüência de A foi 7,5%, nos pacientes com hipertensão arterial sistêmica foi 9,8%, nos pacientes com diabetes mellitus foi 10,0%, nos pacientes com outra doença auto-imune foi 11,1%, nos pacientes com LES familiar foi 10,8%, e nos pacientes com história de outra doença auto-imune familiar foi de 12,5 %. Com relação à titulação dos anticorpos antinucleares, nos pacientes com FAN até 1/320 a freqüência do alelo A foi de 5,5%, naqueles com FAN acima de 320 e abaixo de 2560 a freqüência do alelo A foi de 8,7% e nos pacientes com FAN igual ou maior que 2560 a freqüência do alelo A foi de 11,8%.

Característica nosológica	Pacientes no subgrupo	Freqüência do alelo A	*p*
Início LES até 18 anos	45	10,0 %	0,4360
Início LES 18-36 anos	112	6,6 %	1,000
Início LES mais 36 anos	50	10,0 %	0,4070
4 ou 5 critérios ACR	113	7,0 %	1,000
6 ou 7 critérios ACR	78	8,4 %	0,6963
mais que 8 critérios ACR	16	15,6 %	0,1491
FAN até 320	63	5,5 %	0,7365
FAN 640 - 1280	97	8,7 %	0,5291
FAN maior 1280	38	11,8 %	0,2156

Tabela 4 – Freqüência do alelo A no grupo de casos conforme estratificados conforme subfenótipos que indicam as características clinicas da doença. A significância estatística foi tirada tendo como referência a freqüência do alelo A no grupo controle (p/contr) e no grupo de lúpicos expurgado dos pacientes que já compunham o grupo sob análise.

6. DISCUSSÃO

Considerando o conjunto de dados referentes à patogenia do lúpus eritematoso sistêmico, a possível participação do gene PDCD1 nesse concerto, o envolvimento do segmento cromossomial 2q.37.1, os modelos murinos de auto-imunidade interessando a molécula PD-1 e seus ligantes, e os estudos de associação efetuados por Prokunina (2002) e Ferreiros-Vidal (2004), algumas questões importantes restam por ser esclarecidas:

1. O gene PDCD1 está efetivamente associado à ocorrência do lúpus eritematoso sistêmico?
2. O polimorfismo G/A na posição 7146 do gene seria o polimorfismo causal responsável pela possível associação?
3. O polimorfismo G/A na posição 7146 do gene seria, alternativamente, um marcador efetivo para essa possível associação?
4. Qual o comportamento desse polimorfismo em outras populações humanas, de diferentes ancestralidades?
5. Há diferença na expressão funcional da proteína PD-1 em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico?
6. A posição intrônica 7146 do gene PDCD1 tem realmente um caráter regulador sobre a expressão gênica, e a variação de guanina para adenina nesse locus acarreta variabilidade fenotípica quantitativa na expressão do gene?
7. Quais as perspectivas futuras para a exploração do gene *PDCD1* e do genoma lúpico como um todo?

O presente trabalho visa contribuir com dados adicionais para a quarta das questões postas acima. Tentaremos também, ao final desta discussão, responder às outras perguntas formuladas.

Pesquisas iniciais que justificaram atenção sobre o gene PDCD1 e o polimorfismo 7146-G/A em pacientes lúpicos originaram-se do grupo de Marta Alarcón-Riquelme e colaboradores, na Universidade de Upsalla, na Suécia. Estudos de ligação (linkage) pan-genômicos (wide genoma screening) apontaram o segmento 2q37.1 no braço longo do cromossomo dois como um sítio fortemente suspeito em famílias com casos múltiplos de SLE (LINDQVIST 2000). Nesse segmento está o gene PDCD1, de papel importante na imunorregulação, e implicado em modelos murinos de quadros lúpus-símile e auto-imunidade. Foram identificados, inicialmente, em dez indivíduos escandinavos, sete SNPs em loci exônicos e intrônicos de PDCD1 (PROKUNINA, 2002) e sua composição haplotípica. Trabalhando com populações de origem escandinava, euro-americana e mexicana Prokunina (2002) observou que o polimorfismo 7146-G/A segregava com o fenótipo lúpico, com predomínio do alelo A nos indivíduos doentes. Ferreiros-Vidal (2004), por sua vez, trabalhando com populações de cinco regiões da Espanha, também observou que o polimorfismo 7146-G/A segregava com o fenótipo lúpico, porém com predomínio do alelo G nos indivíduos doentes. A plausibilidade fisiológica do polimorfismo 7146-G/A é grande, considerando-se que o locus tem características de um sítio de ligação do fator de transcrição Runx-1. Qual seria, então, a razão da discrepância entre os achados dos dois estudos?

Antes de tudo é necessário considerar que apenas 16 a 30% das associações inicialmente relatadas na literatura são consistentemente replicadas em estudos subseqüentes (LOHMUELLER KE, 2003). Uma causa comum é o hiperdimensionamento do efeito do polimorfismo no primeiro trabalho publicado, conhecido no jargão técnico como winner's curse (SPECTOR 2006), um fato reconhecido mas é de difícil confirmação em trabalhos individuais, sobretudo no caso em tela já que houve consistência nas quatro populações estudadas por Prokunina (2002). Outra possível causa de não-replicação é o tamanho amostral

pequeno nos estudos subseqüentes, gerando resultados falso-negativos, o que também não parece ser o caso, pois Ferreiros-Vidal (2004) trabalhou com 518 lúpicos e 800 controles. Outra possível causa é a ocorrência de estratificação na população estudada, gerando grupos de casos e controles heterogêneos do ponto de vista da ancestralidade, o que também não se aplica ao caso, pois os controles de Prokunina (2002) foram familiares sem a doença, e o pareamento na Espanha parece ter sido confiável e reprodutível em cinco regiões diferentes. Ferreiros-Vidal (2004) considera, então, a possibilidade de que o locus 7146 não seja o polimorfismo causal, mas que o gene PDCD1 seja efetivamente associado ao lúpus através de um outro polimorfismo causal, a ser identificado, em desequilíbrio de ligação com locus 7146. Heterogeneidade genética por diferentes ancestralidades nas populações estudadas justificaria a variabilidade no locus 7146, sem alterar o vínculo com o SNP causal em bloco haplotípico comum.

Um estudo de associação ideal demandaria a exploração exaustiva da variabilidade do gene, com identificação de todos SNPs, formação de haplótipos e identificação do SNP associado ao fenótipo e testagem para expressão funcional. A exploração da variabilidade de PDCD1 por ocasião da execução dos estudos citados era limitada a menos que dez SNPs. Até 2004, outros pesquisadores já haviam identificado outros 35 SNPs no gene. Com relação ao sítio de ligação de Runx-1 na posição 7146, Ferreiros-Vidal (2004) reconhece 170 outros possíveis sítios de ligação de Runx-1 e outros fatores de transcrição em segmentos intrônicos de PDCD1. Logo, abundam possibilidades para o real SNP causal, podendo inclusive ser diferentes SNPs em diferentes indivíduos, e haver mais de um SNP em um mesmo indivíduo, agindo somatória ou sinergicamente (epistase).

Para melhor explorar a discrepância observada, Ferreiros-Vidal e colaboradores (2007) fizeram um mapeamento do continente europeu genotipando PDCD1/7146-G/A em lúpicos e controles na Finlândia, República Tcheca, Alemanha, Hungria, Grécia e Itália

(Nápoles, Roma e Milão), acrescidas às amostras originais da Suécia e Espanha. O resultado mostra um gradiente (cline) na freqüência alélica de A apenas nos controles através do continente, com valores menores no nordeste (Finlândia – 5,5%) e maiores no sudoeste (Espanha – 15%). Por sua vez a freqüência de A em lúpicos mantém-se homogênea em todo o continente, numa faixa entre 8% a 12%. Esse tipo de gradiente – genético, cultural e lingüístico – é comum em todos os continentes (CAVALLI-SFORZA, 1997) e mostra que a existência de heterogeneidade numa população mesmo que aparentemente homogênea como os chamados "caucasianos" pode acarretar viés em estudos de epidemiologia genética.

Nesse cenário, justifica-se estudar mais a fundo a associação entre lúpus e o gene PDCD1, tanto epidemiologicamente, tentando reproduzir a associação em novas e diferentes populações, como fisiologicamente, tentando evidenciar expressão protéica diferenciada e disfunção imune dependente de PDCD1 no fenótipo definido. Spector e colaboradores (2006) distinguem duas categorias em trabalhos subseqüentes a uma descrição original de associação: estudos de "replicação" quando realizados em população etnicamente similar à do trabalho original, e estudos de "confirmação" quando realizados em populações distantes étnica e geograficamente da população original. Ambos os tipos são necessários para validação de um trabalho de associação.

Nosso trabalho visou confirmar os achados originais de Prokunina (2002) e Ferreiros-Vidal (2004) em população diferente geograficamente, oriunda da Amazônia brasileira, com uma importante composição de etnia ameríndia. Nossos resultados mostraram freqüências similares do alelo A em casos (8,2%) e controles (6,9%), sem diferença estatisticamente significante. Freqüências genotípicas GG, GA e AA foram igualmente similares entre casos e controles (85,5% versus 87,1% para GG, 12,6% versus 11,9% para GA, e 1,9% versus 1,0% para AA). Ambos os grupos amostrais atendiam ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esses resultados são compatíveis com a interpretação de Ferreiros-Vidal (2004) de que o

polimorfismo 7146-A/G não é causal no lúpus eritematoso sistêmico, podendo apenas estar em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo causal efetivo em SNP adjacente.

Alguns aspectos metodológicos devem ser destacados na abordagem do tema na população Amazônica. Tentou-se caracterizar a população estudada como realmente procedente da região, através do levantamento do local de nascimento de três gerações incluindo o indivíduo índex (caso ou controle), pais e avós. A maioria (63,6% e 52,3%) em ambos os grupos tem três gerações de nascidos na Amazônia, com 1,7% e 9,2% não naturais da Amazônia. Reconhecemos, entretanto, que esse tipo de dado peca por viés de memória, já que muitas vezes os casos índex desconhecem a procedência e mesmo a identidade dos antepassados. A maioria dos trabalhos publicados na literatura não mostra preocupação especial com esse rastreamento de procedência, se bem que o fluxo migratório interno em outros países pode não ser tão grande como o observado no Brasil, particularmente na região de Manaus. Outra abordagem é a anotação da "cor autodefinida" conforme prática adotada no Brasil pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) em recenseamentos demográficos. Reconhecemos que cor, e por extensão "raça", é um conceito praticamente inútil, e eventualmente pernicioso, em estudos de saúde, pois a cor da pele como outros caracteres fenotípicos externos são determinados por um pequeno número de genes que não estão necessariamente ligados em desequilíbrio a polimorfismos causais de doenças, podendo ser, outrossim, marcadores sociais de um processo histórico, cultural e político que determinou efetivamente a condição mórbida. Por outro lado, estudos de Alves-Silva (2000) e Carvalho-Silva (2001) com marcadores genômicos de ancestralidade reforçam a tipicidade étnica de nosso estudo, ao relatar que a população da Região Norte do Brasil tem uma composição mista – com o maior componente ameríndio (54%) entre as cinco regiões do país, além de componente euro-ibérico (31%), afro-descendente (15%), e traços do oriente próximo.

As taxas que obtivemos do alelo A em controles foram menores que as observadas no México, país que poderia historicamente ter ancestralidade similar à nossa. Como o alelo A é uma mutação possivelmente européia, com pequena prevalência na África (SANGHERA DK, 2004). e inexistente na Ásia Oriental (LIN SC, 2004), presume-se que a amostragem mexicana tenha um maior componente de euro-descendência que a nossa amostragem no Amazonas. Não há relato da variabilidade 7146-G/A em populações etnicamente isoladas de ameríndios.

Uma preocupação obrigatória em um estudo de associação genética em casos e controles é não haver estratificação populacional, que ocorreria quando indivíduos de diferentes ancestralidades figuram em diferentes proporcionalidades entre casos e controles, o que acarretaria resultados falso-positivos ou falso-negativos (CLAYTON DG, 2005). Para evitar esse viés é importante o grupo controle reproduzir com fidelidade as características do grupo de casos. Marcadores genéticos de ancestralidade (FAFF 2004) são SNPs que permitem caracterizar com precisão a origem geográfica remota, continental, de cada indivíduo e pode apontar estratificação em um dos grupos. Na falta desse recurso tenta-se incluir no grupo controle indivíduos com características pessoais, sócio-econômicas, culturais, geográficas e até religiosas próximas às do grupo de casos. No nosso estudo, a composição do grupo controle contou com predomínio de profissionais hospitalares, voluntários, sendo a maioria de nível técnico ou de apoio, não fugindo ao padrão demográfico do grupo de casos. Optamos, também, intencionalmente, por incluir mulheres de faixa etária maior. Já que o fenótipo lúpico predomina na mulher na faixa reprodutiva, esse cuidado evitaria que mulheres jovens, com possibilidade de ainda virem a desenvolver lúpus, entrassem no grupo controle. Não haveria desvantagem, pois o genótipo é um traço estável que não muda com a idade ou com outros fatores circunstanciais.

Outro cuidado que tomamos foi analisar o polimorfismo 7146-G/A no grupo de lúpicos como um todo, e em subgrupos definidos por características clínicas, patológicas ou epidemiológicas. Esse cuidado procede, pois na literatura há relatos de associação não com o fenótipo lúpico inteiro, mas com subfenótipos como a positividade para o anticorpo anticardiolipina (SANGHERA DK, 2004), a presença de nefrite (PROKUNINA L, 2004) e em lúpus pediátrico (VELASQUEZ-CRUZ, 2007). Verificamos a freqüência do alelo A em portadores de cada um dos onze critérios do American College of Rheumatology (TAN E, 1982); em subgrupos formados conforme o número de critérios acumulados por paciente, como indicador indireto de gravidade da doença; e em subgrupos formados conforme a idade de início da doença. Não observamos, entretanto, diferença na freqüência de A entre qualquer subgrupo e o referencial comparativo, seja o grupo controle propriamente dito, seja o grupo de lúpicos expurgado dos pacientes engajados no subgrupo observado.

Vale ressaltar que a tipologia de nossos lúpicos, conforme o padrão de acometimento clínico, é representativa de um Serviço de Reumatologia, com a maioria dos pacientes apresentando manifestações cutâneo-articulares. Caso a captação de casos fosse feita em um Serviço de Nefrologia, ou Hemodiálise ou Transplante, haveria um predomínio de manifestações renais. Caso a captação de casos fosse feita em um Serviço de Dermatologia, haveria maior número de casos com lesões discóide e baixa grau de morbidade clínica. Fizemos subanálise em três tipologias lúpicas – cutâneo/articular, renal/neurológico, e anti-cardiolipina/trombótico. Em nenhum desses subgrupos houve predominância do alelo A em comparação com a freqüência em controles ou no grupo de lúpus expurgado dos incluídos no subgrupo.

Dois outros aspectos de discussão se impõem face ao avanço do conhecimento nas áreas de genética e genômica, e das técnicas atuais de alta vazão para o seqüenciamento de

DNA. O primeiro é como fica a pesquisa de um SNP isolado, candidato por localização cromossômica ou por plausibilidade fisiológica, na era do Hap-Map (The International HapMap Consortium, 2005). Outro aspecto é a perspectiva que toma avaliações de SNPs individuais na era dos mega-estudos de associação, pan-genômicos (GWA –genoma wide association studies), quando centenas de milhares de SNPs são testados simultaneamente para associação com fenótipos específicos em populações de milhares de casos e controles (SLADEK 2007, The Wellcome Trust Case Control Consortium 2007).

O projeto HapMap foi lançado em 2002 com o objetivo de criar uma base de dados extensiva e exaustiva das variações puntiformes (SNPs) comuns (mais que 5%) do DNA humano, incluindo todos os SNPs não-sinônimos, em 269 indivíduos de ancestralidade africana, européia e asiática, já contabilizando hoje, terminada sua segunda fase, mais de quatro milhões de SNPs, com identificação de pontos de alta recombinação (hotspots) e conseqüente identificação de blocos haplotípicos e respectivos marcadores (tags), visando o suporte público e livre de estudos de associação genética – delineamento e análise – em doenças humanas. Antes do HapMap um estudo de associação completo teria idealmente que escrutinar todos ou a maioria dos SNPs do gene candidato, identificá-los, localizá-los, e organizá-los em haplótipos através de pesados programas computacionais. Com o HapMap economiza-se tempo e recursos nessa faina, testando-se preferencialmente a associação do SNP marcador (tag) com o fenótipo fisiológico ou patológico desejado. No caso do gene PDCD1 esse recurso não pode ser empregado porque PDCD1 não consta do acervo do HapMap pois, por obra do acaso, não foi captado em nenhum clone BAC (bacterial artificial chromossome) usado para amplificação, seqüenciamento e montagem do Projeto Genoma Humano (ALARCON-RIQUELME ME, 2006). Entretanto, a localização do gene em 2q.37 é aceita sem disputa com base no trabalho de hibridização in situ feito por Shinohara (1994) e pelo seqüenciamento alternativo do Sanger Center (http://www.ensembl.org).

O advento de novas metodologias que tornam o sequenciamento do DNA mais rápido e mais barato permitiu abrir um novo capítulo na história da Genômica, através do advento de grandes estudos de associação com varredura integral do genoma (genoma wide association – GWA), lendo simultaneamente 500.000 polimorfismos em grandes coortes como a do Wellcome Consortium (2007), composta por 14.000 pacientes e 3.000 controles. Com tal abundância prescinde-se de genes "candidatos" por posicionamento ou aptidão, pois são seqüenciados todos os tags do HapMap, todas as variações não-sinônimas comuns (>5%), SNPs regulatórios e outros SNPs estratégicos ou posicionais. Com essa perspectiva, a par de avanços na área da bio-informática e da genômica funcional, espera-se desvendar o enigma das doenças complexas, abrindo vias para diagnósticos e tratamentos individualizados.

CONCLUSÃO

Com base nos dados publicados até a presente data e com os dados do atual trabalho, podemos considerar que:

1. O gene PDCD1 está efetivamente associado ao lúpus eritematoso sistêmico, sendo um dos muitos genes que participam de sua patogenia.

2. O polimorfismo 7146-G/A possivelmente não é o polimorfismo causal que determina a participação de PDCD1 na patogenia do lúpus eritematoso sistêmico.

3. A associação de PDCD1 ao LES dar-se-ia por desequilíbrio de ligação a outro polimorfismo efetivamente causal.

4. As freqüências alélicas de A e G no polimorfismo PDCD1-7146 variam conforme a população estudada e sua ancestralidade, com a prevalência em controles conferindo viés nas análises de associação.

5. A expressão funcional de PDCD1 não está conclusivamente estudada no lúpus eritematoso sistêmico, com indícios preliminares de perda de função (Alarcon-Riquelme, 2006).

6. A regulação da expressão fisiológica de PDCD1 está por ser explorada, havendo indícios da necessidade de ajustamento fino de sua ação na regulação da proliferação imune, na blindagem de tecidos periféricos à agressão auto-imune e na exaustão do sistema imune face a infecções agudas e crônicas.

7. A exploração de SNPs e variabilidade genômica no LES e outras doenças complexas auto-imunes está num momento histórico de extraordinária produtividade, com o advento de técnicas de alta vazão, como o GWA, e a conseqüente possibilidade da dissecção molecular de cada doença, a possibilidade de descortinar da interação dos genes imunorregulatórios com o meio ambiente, e por fim a possibilidade de desenvolvimento de medidas profiláticas e terapêuticas eficazes, específicas, pontuais, sobretudo, customizadas ao perfil genômico do paciente.

R E F E R Ê N C I A S

ABBAS KA, *et al* (2004). T cell tolerance and autoimmunity. Autoimmunity Reviews 3: 471– 475.

ALARCÓN-RIQUELME ME (2003). A RUNX trio with a taste for autoimmunity. Nat Genet 35:299-300.

ALARCÓN-RIQUELME ME (2006). The genetics of systemic lupus erythematosus: understanding how SNPs confer disease susceptibility. Springer Semin Immun 28:109–117.

ALARCÓN-SEGOVIA D, ALARCON-RIQUELME ME (2004). Etiopathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. In *Systemic Lupus Erythematosus* (4th edn) (Lahita RG, ed) pp. 93-107, Academic Press.

ALBERT ML, SAUTER B, BHARDWAJ N (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class-II restricted CTL. Nature 392:86.

ALVES-SILVA J, *et al* (2000). The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. Am J Hum Genet 67:444-461.

ANSARI, MJ, *et al* (2003) The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. J. Exp. Med. 198, 63–69.

BACALA R, *et al* (2007). TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. Nature Medicine 13:543-551.

BALDE AT, SARTHOU J-L, ROUSSILHON C (1995). Acute Plasmodium falciparum infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. Immunol Lett 46:59-62.

BALLESTAR E, ESTELLER M, RICHARDSON BC (2006). The epigenetic face of systemic lupus erythematosus. J Immunol, 176:7143-7147.

BARBER DF, *et al* (2005) PI3Kγ inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. Nat Med 11:933-935.

BARBER DL, *et al* (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439: 682-687.

BEESON PB (1994). Age and sex associations of 40 autoimmune diseases Am J Med 96:457-62.

CARVALHO-SILVA DR, *et al* (2001). The phylogeography of Brazilian Y-chromossome lineages. Am J Hum Genet 68:282-286.

CASCIOLA-ROSEN L, ROSEN A (1997). Ultraviolet light-induced keratinocyte apoptosis: a potential mechanism for the induction of skin lesions and autoantibody production in SLE. Lupus 6: 175-180,.

CAVALLI-SFORZA LL (1997). Genes, peoples, and languages. Proc Natl Acad Sci USA 94:7719–7724.

CHONG WP, *et al* (2004) Association of interleukin-10 promoter polymorphisms with systemic lupus erythematosus. Genes Immun;5:484–92.

CITORES MJ, *et al* (2004). The dinucleotide repeat polymorphism in the 3'UTR of the CD154 gene has a functional role on protein expression and is associated with systemic lupus erythematosus**.** Ann Rheum Dis 63:310-8.

CLAYTON DG, *et al* (2005). Population structure, differential bias and genomic control in a large-scale, case–control association study. Nat Genet 37: 1243–1246.

COHEN PL (2007). Apoptotic cell death and lupus. Springer Semin Immun 28:145-152.

DAVIDSON A, *et al* (2005). Block and tackle: CTLA4Ig takes on lupus. LUPUS 14:197-203.

DONG, H. *et al* (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. Nat. Med. 8, 793–800.

EMLEN W, NIEBUR J, KADERA R (1994). Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. J Immunol;152:3685–92.

FADOK VA, *et al* (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. J Immunol 148: 2207-2216.

FAFF CL, *et al* (2004). Information on ancestry from genetic markers. Genet Epidemiol 26:305–315

FERREIROS-VIDAL I *et al* (2004). Association of PDCD1 with susceptibility to systemic lupus erythematosus: evidence of population-specific effects. Arthritis Rheum. 50, 2590–2597

FERREIROS-VIDAL I, *et al* (2007). Bias in association studies of systemic lupus erythematosus susceptibility due to geographical variation in the frequency of a programmed cell death 1 polymorphism across Europe. Genes and Immunity 8, 138–146.

FINGER LR, *et al* (1997). The human PD-1 gene: complete cDNA, genomic organization, and developmentally regulated expression in B cell progenitors. Gene 197:177–87.

FREEMAN GJ, *et al* (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J Exp Med;192:1027–34.

GAFFNEY PM, *et al*. (2000). Genome screening in human systemic lupus erythematosus: results from a second Minnesota cohort and combined analyses of 187 sib-pair families. *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 547–566

GRAHAM RR, *et al* (2002). Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. Am J Hum Genet 71:543-553.

GRIMALDI CM (2006). Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. Curr Opin Rheumatol 18:456–461.

GRIMALDI MC, *et al* (2005). Hormonal modulation of B cell development and repertoire selection. Mol Immunol 42:811-820,.

GROSS JA, *et al* (2000). TACI and BMCA are receptors for a TNF homologue implicated em B-cell autoimmune disease. Nature 404:995-999.

GROSS JA, *et al* (2005). Epstein Barr Vírus and SLE: a new perspective. J Immunol, 174:6499-6607.

GULERIA I, *et al* (2005). A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. J. Exp. Med. 202, 231–237.

GUSTINCICH S, *et al* (1991). A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. Biotechniques. Sep;11(3):298-300, 302.

HAHN BH (1998). Mechanisms of disease: antibodies to DNA. N Engl J Med; 338:1359-1368

HAN GM, *et al* (2003). Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray. Genes Immunity 4:177-186.

HARLEY JB, *et al* (1989). A model for disease heterogeneity in systemic lupus erythematosus. Relationships between histocompatibility antigens, autoantibodies and lymphopenia ou renal disease. Arthritis Rheum, 32:826-836.

HOFFMAN RW (2004). T cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Clin Immunol 113:4-13.

HONDA Z (2006). Fcε- and Fcγ-receptor signaling in diseases. Springer Semin Immun 28:365–375.

HUBER LC, (2006). The effect of UVB on lupus skin - new light on the role of apoptosis in the pathogenesis of autoimmunity. Rheumatology;45:500–501

HUERTA PT (2006). Immunity and behavior: antibodies alter emotion. Proc Natl Acad Sci U S A. Jan 17;103(3):678-83.

HUTLOFF A (2004). Involvement of induzible co-stimulator (ICOS) in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus.Arthritis Rheum 50:3211-3220.

ISHIDA Y, *et al* (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 11: 3887-3895,.

IWAI Y, *et al* (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 17; 99(19): 12293-12297.

JANUCHOWSKI R, PROKOP J, JAGODZINSKI PP (2004).Role of epigenetic DNA alterations in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. J. Appl. Genet. 45:237-248.

JANCAR S, SANCHEZ-CRESPO M (2005). Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm. Trends Immunol, 26:48-55.

JOHANSSON M, *et al* (2005). Association of a PDCD1 polymorphism with renal manifestations in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 52:1665-9.

KHOURY SJ, SAYEGH MH (2004). The roles of the new negative T cell costimulatory pathways in regulating autoimmunity. Immunity 20, 529–538

KIRCHBERGER S, *et al* (2005). Human rhinoviruses inhibit the accessory function of dendritic cells by inducing sialoadhesin and B7-H1 expression. J. Immunol. 175, 1145–1152.

KIROU KA, *et al* (2005). Activation of the interferon-alfa pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. Arthritis Rheum 52:1491-1503.

KONG EK, *et al* (2005). A new haplotype of *PDCD-1* is associatede with rheumatoid arthritis in Hong-Kong Chinese. Arthritis Rheum, 52:1058-1062.

KRONER A, *et al* (2005). A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 58: 50-57.

LAHITA RG (1999). The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. Curr Opin Rheumatol, 11:352-356.

LAMASON R (2006). Sexual dimorphism in immune response genes as a function of puberty. BCM Immunol, 7:1471-84.

LATCHMAN Y, *et al* (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. Nat Immunol;2:261–8.

LENERT PS (2006). Targeting Toll-like receptor signaling in plasmacytoid dendritic cells and autoreactive B cells as a therapy for lupus. Arthritis Research & Therapy, 8:203-314.

LIN SC, *et al* (2004). Association of a programmed death 1 gene polymorphism with the development of rheumatoid arthritis, but not systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum, 50:770–775.

LINDQVIST AK, *et al* (2000). A susceptibility locus for human systemic lupus erythematosus (hSLE1) on chromosome 2q. J Autoimmun 2000, 14:169–178.

LIU MF, *et al* (2003). Increased expression of soluble cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 molecule in patients with systemic lupus erythematosus, Scand. J. Immunol. 57 568–572.

LOHMUELLER KE, *et al* (2003). Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. Nat Genet 33:177–82.

MAGNUSSON V, *et al* (2001). Cytokine polymorphisms in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. Scand J Immunol, 54:55–61.

MEANS TK, *et al* (2006). Human lupus autoantibody–DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. J Clin Invest 115:407-418.

MILNER ECB, *et al* (2005). Human innate B cells: a link between host defense and autoimmunity? Sringer Semin Immunopathol, 26:433-452.

MONTECINO-RODRIGUEZ E, DORSHKIND K (2006). New perspectives in B-1 B cell development and function. Trends Immunol 27:428-434.

MORISON WL (2004). Photosensitivity. N Eng J Med 350:1111-1117.

NAMBIAR MP, *et al* (2003). Prevalence of T cell receptor zeta chain deficiency in systemic lupus erythematosus. Lupus 12(1):46-51.

NCBI – National Center of Biotechnology Information (2006), disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=snp&cmd=search&term=PDCD1, acessado em 21/07/2006

NIELSEN C, *et al* (2003). Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. Tissue Antigens, 62:492–497.

NIELSEN C, *et al* (2004). A putative regulatory polymorphism in PD-1 is associated with nephropathy in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. Lupus 13:510-516.

NIELSEN C, *et al* (2005). Alternative splice variants of the human PD-1 gene. Cell Immunol 235 109–116

NISHIMURA H, HONJO T (2001). PD-1: na inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. Trends Immunol 22:265-268.

NISHIMURA, H. et al (1999). Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motifcarrying immunoreceptor. Immunity 11, 141–151.

OKAZAKI T, *et al* (2003). Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. Nat. Med. 9, 1477–1483

OKAZAKI T, HONJO T (2006). The PD-1 pathway in immunological tolerance. Trends Immunol 27:195-201.

PAPADIMITRAKI ED, *et al* (2006). Expansion of Toll-like Receptor 9–Expressing B Cells in Active Systemic Lupus Erythematosus - Implications for the Induction and Maintenance of the Autoimmune Process. Arthritis Rheum 54:3601–3611.

PANAYI GS, *et al* (1992). The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis [editorial]. Arthritis Rheum;35:729–35.

PASSOS LF (1997). Apoptosis and SLE: another piece in the puzzle? Rev Bras Rheum, 37:327-334.

PASSOS LF (2000). Great Expectations: SLE and the Human Genoma Project. Rev Bras Rheum 40:291-304.

PETROFF MG, *et al* (2003). B7 family molecules are favorably positioned at the human maternal-fetal interface. Biol. Reprod. 68, 1496–1504

PROKUNINA L, *et al* (2002). A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. Nat Genet, 32:666–669.

RAHMAN AH, EISEMBERG RA (2006). The role of toll-like receptors in systemic lupus erythematosus. Springer Semin Immun 28:131–143.

RICHARDSON B (2003). DNA methylation and autoimmune disease. Clinical Immunol 109:72–79.

RIEMEKASTEN G, HAHN BH (2005). Key autoantigens in SLE. Rheumatology 44: 975-982

RODRIGUEZ-REYNA TS, ALARCÓN-SEGOVIA D (2006). The different faces of shared autoimmunity. Autoimmunity Reviews 5:86-88.

ROSE LM, LATCHMAN DS, ISENBERG DA (1997). Apoptosis in peripheral lymphocytes in systemic lupus erythematosus: a review. Br J Rheumatol 36:158-163.

RUSSELL AI, *et al* (2004). Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus. Hum Mol Genet, 13:137–147.

SALAMA AD, *et al* (2003). Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Exp. Med. 198, 71–78.

SÁNCHES E, *et al* (2006). Association study of genetic variants of pro-inflammatory chemokine and cytokine genes in systemic lupus erythematosus. BMC Medical Genetics, **7**:48-56.

SANGHERA DK, *et al* (2004). Role of an intronic polymorphism in the PDCD1 gene with the risk of sporadic systemic lupus erythematosus and the occurrence of antiphospholipid antibodies. Hum Genet 115: 393–398.

SHIN HD, *et al* (2005). DNase II polymorphisms associated with risk of renal disorder among systemic lupus erythematosus patients. J Hum Genet 50:107–111.

SHINOHARA T, *et al* (1994). Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics* 23: 704-706.

SIGAL LH (2007). Handling the Corpses: Apoptosis, Necrosis, Nucleosomes and (Quite Possibly) the Immunopathogenesis of SLE. J Clin Rheumatol 13: 44–48)

SLADEK R, *et al* (2007). A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. Nature 445:881-5.

SMITH P, *et al* (2004). Schistosoma mansoni worms induce anergy of T cells via selective up-regulation of programmed death ligand 1 on macrophages. J. Immunol. 173, 1240–1248

SPECTOR TD, *et al* (2006). When is a replication not a replication? Or how to spot a good genetic association study? Arthritis Rheum 54:1051-1054.

STOHL W (2002). Systemic Lupuz Erythematosus: a blissless disease of too much BLyS (B Lymphocyte Stimulator) protein. Curr Opin Rheumatol, 14:522-528.

SZYPER-KRAVITZ M, *et al* (2005). The neuroendocrine-immune interactions in systemic lupus erythematosus: a basis for understanding disease pathogenesis and complexity. Rheum Dis Clin North Am. Feb;31(1):161-75.

TAKAHASHI R, *et al* (2005). Association of mannose binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis;64;311-314.

TAN EM, *et al* (1982). The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 25:1271-1277.

The International HapMap Consortium, 2005. A haplotype map of the human genome. Nature;437:1299-320.

TSUKUMO S, YASUTOMO K (2004). DNaseI in pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Clinical Immunology 113:14– 18.

THE WELLCOME TRUST CASE CONTROL CONSORTIUM (2007) Genome-wide association study of 14000 cases of seven common diseases and 3000 shared controls, Nature 447:661-669.

TSAO BP, *et al* (1999). PARP alleles within the linked chromosomal region are associated with systemic lupus erythematosus. J Clin Invest, 103:1135–1140.

VASOO S (2006). Drug-induced lupus: an update. Lupus 15, 757–761.

VELÁZQUEZ-CRUZ R, *et al* (2007). Association of PDCD1 polymorphisms with childhood-onset systemic lupus erythematosus. Eur J Hum Genet. 15:336-41.

WALLACE DJ, HANNAHS BD (eds) (2002). Dubois' Lupus Erythematosus. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

WANG J, *et al* (2005). Establishment of NOD-Pdcd1K/K mice as an efficient animal model of type I diabetes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 11823–11828

WANG S, CHEN L (2004). Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. Microbes Infect. 2004 Jul;6(8):759-66.

WATTS C, *et al* (2007). Proximal effects of Toll-like receptor activation in dendritic cells. Cur Opinion Immunol, 19:73–78

WILSON KB, EVANS M, ADBOU NI (1996). Presence of a variant form of the estrogen receptor in peripheral blood mononuclear cells from normal individuals and lupus patients. J Reprod Immunol 31:199-208.

WOOSLEY RL, *et al* (1978). Effect of acetylator phenotype on the rate at which procainamide induces antinuclear antibodies and the lupus syndrome. N Engl J Méd 298: 1157-1159.

YU CY, WHITACRE CC (2004). Sex, MHC and complement C4 in autoimmune diseases. Trends Immunol; 25:694-699.

ZHANG J, *et al* (2001). Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus. J Immunol 166:6-10.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Investigador: LUIZ FERNANDO DE SOUZA PASSOS

Instituição: Universidade Federal do Amazonas

Telefone: (92) 8123-9311 (92)3236-5231

Título: POLIMORFISMO GENÉTICO DO RECEPTOR II-B DO FRAGMENTO Fc DA IMUNOGLOBULINA G (FcγRIIB) EM PACIENTES AMAZÔNICOS COM LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Patrocinador e Executor: Universidade do Amazonas/ Doutorado Multi-Institucional em Biotécnologia

Colaboração: *Laboratório de Tecnologia do DNA-ICB / Ambulatório Araujo Lima (HUGV–UFAM*)

Descrição e objetivo do estudo:

*Este estudo visa investigar a presença da variante polimórfica do receptor IIB do fragmento Fc da imunoglobulina G (*FcγR-IIB) *com o aminoácido isoleucina na posição 232 no lugar do original treonina. Essa variante polimórfica é um possível fator causal na patogenia do Lupus Eritematoso Sistêmico. O trabalho consta da coleta de uma amostra de sangue venoso de pacientes lúpicos e de indivíduos controles, procedendo-se genotipagem por PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment lenght polymorphism).*

Riscos associados ao estudo:

O risco físico associado ao estudo é mínimo, relativo exclusivamente à flebopunção. Está garantido que o material genético colhido será utilizado exclusivamente para o estudo de fatores genéticos associados à etiologia do Lupus Eritematoso Sistêmico.

Benefícios:

Não há benefícios imediatos para o paciente. Há o benefício potencial através da descoberta de um fator genético importante na causa da doença, que poderá vir a gerar novas modalidades de tratamento para os pacientes lúpicos.

Haverá ressarcimento por eventuais despesas decorrentes da participação de acordo com as normas legais vigentes.

Confidencialidade e avaliação dos registros:

Estão garantidos o anonimato e a confidencialidade dos registros ou resultados dos testes relacionados ao estudo, que serão mostrados apenas a representantes dos órgãos executores, e a instâncias científicas nacionais e internacionais.

Direito à retirada do estudo:

Garante-se ao participante o direito de fazer qualquer pergunta referente aos riscos potenciais ou desconhecidos, durante a participação neste estudo. A qualquer momento garante-se a possibilidade de solicitar o encerramento da participação no mesmo.

O participante será consultado com antecedência caso outros estudos venham ser realizados com a amostra coletada e, sempre que necessário se fizer, contactarei os executores do projeto, no endereço: Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000 – Mini-Campus, Bloco "G", Laboratório de Tecnologias de DNA; Tele/Fax : (92) 6474229.

Participação voluntária:

A participação neste estudo é voluntária. Se o paciente ou indivíduo controle se recusar a participar, não haverá qualquer tipo de retaliação ou perda de benefícios a que eu tenha direito.

O participante tem o direito de manter uma cópia assinada deste documento.

Consentimento pós-informação:

Após ter recebido informações claras sobre o conteúdo deste termo, livremente, expresso meu consentimento, eu concordo com minha participação, como sujeito, no estudo.

DATA

_____

_____/_____/_____

ASSINATURA – Paciente ou indivíduo controle

DATA

_____

_____/_____/_____

ASSINATURA – Pesquisador Responsável

Impresão datiloscópica
(p/ analfabeto)

ANEXO 2

UNIVERSIDADE DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

QUESTIONÁRIO – PACIENTE **Data: ____/____/____**

Título: Polimorfismo genético do receptor II-B do fragmento Fc da imunoglobulina G (FcγRIIB) em pacientes amazônicos com Lupus Eritematoso Sistêmico.

Nome: _____

Sexo ( ) Feminino ( ) Masculino Data de Nascimento: ____/____/____

Tabela de etnia

	Local de nascimento	Cor/Etnia
Paciente		
Pai		
Avô Paterno		
Avó Paterna		
Mãe		
Avô Materno		
Avó Materna		

Acompanhamento ( ) AALima ( ) HFM ( ) HAM ( ) NH ( ) COM

Prontuário AAL: _____

Outras formas de contato: _____

Critérios do ACR Ano do Diagnóstico: _____

( ) Fotossensibilidade ( ) Artrite ( ) Neurológico
( ) Rash Malar ( ) Sorológico ( ) Serosite
( ) Rash Discóide ( ) Rim ( ) FAN
( ) Úlcera Oral ( ) Hematológico

Hematológicos ( ) AHAI ( ) Púrpura ( ) Leocopenia

Neurológico ( ) Convulsões ( ) Psicose ( ) AVC ( ) Coréia

Renais ( ) Biópsia ( ) EAS ( ) IRC – Hemodiálise

Histórico Familiar ( ) LES ( ) AR + ( ) Tireóide ( ) TB ( ) MH ( ) Outras auto-imunes

CO – MORB ( ) HAS ( ) Diabetes Mellito ( ) Outras auto-imunes

Medicação atual: _____

UNIVERSIDADE DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

QUESTIONÁRIO – CONTROLE **Data: ____/____/____**

Título: Polimorfismo genético do receptor II-B do fragmento Fc da imunoglobulina G (FcγRIIB) em pacientes amazônicos com Lupus Eritematoso Sistêmico.

Nome: _____

Sexo ( ) Feminino ( ) Masculino Data de Nascimento: ____/____/____

Tabela de etnia

	Local de nascimento	**Cor/Etnia**
Paciente		
Pai		
Avô Paterno		
Avó Paterna		
Mãe		
Avô Materno		
Avó Materna		

De onde foi escolhido o controle: _____

Formas de contato: _____

CHECK-LIST
( ) Artrite ( ) Artralgia ( ) Fotossensibilidade ( ) Erupção Cutânea ( ) Perda de cabelo
( ) Inchaço ( ) Hipertensão ( ) Anemia ( ) Tireóide ( ) Tuberculose
( ) MH

Histórico na Família ( ) LES ( ) Artrite Reumatóide ( ) Outras doenças auto-imunes