

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DA LECTINA  
LIGADORA DA MANOSE EM PACIENTES COM LÚPUS  
ERITEMATOSO SISTÊMICO**

**Odirlei André Monticielo**

**Orientador: João Carlos Tavares Brenol**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**  
**2008**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DA LECTINA  
LIGADORA DA MANOSE EM PACIENTES COM LÚPUS  
ERITEMATOSO SISTÊMICO**

**Odirlei André Monticielo**

**Orientador: João Carlos Tavares Brenol**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**  
**2008**

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor João Carlos Tavares Brenol, pela confiança e apoio durante a minha formação acadêmica, como médico reumatologista e pesquisador e por representar um modelo a ser seguido e respeitado.

Ao Professor Ricardo Machado Xavier pela persistente cobrança por crescimento e desenvolvimento acadêmico.

Ao Professor Roberto Eichenberg, pelo apoio e incentivo durante a minha formação profissional.

Ao Professor José Artur Bogo Chies, por ter tido paciência e fundamental contribuição para tudo que aprendi dentro do laboratório durante o desenvolvimento do meu trabalho, além de participar ativamente na realização das minhas atividades científicas.

Ao Dr. Charles Lubianca Kohem, primeiramente por ser uma pessoa fantástica que tive oportunidade de conhecer e por seu importante papel, tanto na minha formação durante a residência médica, quanto no período da pós-graduação.

Ao Dr. Claiton Viegas Brenol, pela amizade e contribuição ativa na minha formação acadêmica e como pesquisador.

À Dra. Tamara Mucenic, pelo convívio e participação no ambulatório de Lúpus Eritematoso Sistêmico e pela contribuição intelectual neste trabalho.

Aos colegas Aline Ranzolin, Sandra Machado, Ilóite Scheibel, Rafael Chakr, Vera Lopes, Rodrigo Bortoli, Penélope Palominos e Yaser Mustafá, pelo convívio harmonioso e participação na minha vida profissional.

Aos alunos de iniciação científica do ambulatório de Lúpus Eritematoso Sistêmico que trabalharam na coleta dos dados e contribuíram para a realização deste trabalho.

À Dra. Briele Keiserman que foi promovida de simples colega para namorada e participou tendo muita paciência e sabedoria ao entender as dificuldades que passei ao longo da realização deste trabalho.

Ao graduando de biologia, Guilherme Rucatti que esteve comigo na realização deste trabalho e contribuiu de maneira significativa para que conseguíssemos ter alcançado estes resultados.

Aos colegas do laboratório de imunogenética, em especial ao Tiago Veit, Nadine Glesse e Gabriela Kniphoff da Silva, pela compreensão e ajuda na realização do trabalho.

À Juliana Rios que, pelo longo convívio, deixou de ser apenas uma secretária para tornar-se praticamente uma irmã. A ela, meus sinceros agradecimentos.

Às colegas da pesquisa, em especial à Leila Krammer, pelo afeto e dedicação durante estes longos dois anos.

Ao meu irmão, Márcio Rafael Monticielo, por ser uma figura humana fantástica e sempre ter tido paciência em ouvir-me e acompanhar-me ao longo da minha trajetória acadêmica. Apesar de longe, ele sempre está ao meu lado.

Aos meus pais, Irineo Adão Monticielo e Lorena Lourdes Monticielo, pessoas maravilhosas e dedicadas que sempre se doaram de maneira integral para ajudar-me em tudo que precisei ao longo da vida. Tudo que sou hoje e o que serei a partir de então, se deve a eles. Apesar da distância, eles sempre estão no meu coração.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	6
1 INTRODUÇÃO.....	8
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	10
2.1 Conceito de Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	10
2.2 Epidemiologia do Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	10
2.3 Etiologia e patogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	13
2.4 Sistema Complemento.....	18
2.5 Lectina ligadora da manose e Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	20
3 OBJETIVOS.....	29
4 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	30
5 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	43
5.1 Artigo original.....	44
5.2 Artigo de revisão.....	65
6 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	72
7 ANEXOS.....	73
7.1 Anexo I - Critérios de classificação do Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	74
7.2 Anexo II - Protocolo de pesquisa.....	76
7.2 Anexo III - Termo de Consentimento.....	77

## RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória sistêmica auto-imune caracterizada pela produção e deposição de imunocomplexos. Sua etiologia é pouco conhecida, mas há evidências da participação de fatores genéticos. Vários genes responsáveis pela síntese de proteínas do Sistema Complemento (SC) têm sido relacionados com LES. O gene *MBL-2* responsável pela síntese da lectina ligadora da manose (MBL - *mannose-binding lectin*), uma proteína envolvida na ativação do SC, apresenta vários polimorfismos que se relacionam com a deficiência desta proteína e, conseqüentemente, estão associados com desenvolvimento de LES. Para verificar a possibilidade de alguns polimorfismos da MBL configurarem risco aumentado para LES e se há alguma interferência destes com as manifestações clínicas e laboratoriais da doença, foi conduzido um estudo de caso-controle, com 327 pacientes lúpicos e 165 controles saudáveis da mesma área geográfica, sendo avaliados os polimorfismos *G57E* (alelo C), *G54D* (alelo B), *IVSnt5*, *R52C* (alelo D) e *R52H* do gene *MBL-2*. A genotipagem foi realizada por *Restriction Fragment Length Polymorphism-Polimerase Chain Reaction* (RFLP-PCR) usando *primers* e enzimas de restrição específicas para cada polimorfismo. Os dados clínicos e laboratoriais foram coletados dos prontuários. Os resultados evidenciaram uma diferença estatisticamente significativa na frequência do alelo D nos pacientes euro-descendentes quando comparados com os controles (9,6% versus 3,3%,  $P=0,001$ , *odds ratio* de 3,01, intervalo de confiança de 95%: 1,58-6,06,  $P<0,05$ ). As frequências dos alelos B e C não foram diferentes nos pacientes euro-descendentes e controles (alelo B: 15,9% versus 18,8%,  $P=0,317$  e alelo C: 3,6%

versus 3,0%,  $P=0,796$ ). Os alelos *IVSnt5* e *R52H* não foram encontrados nesta população. Achados clínicos e laboratoriais não tiveram diferença estatisticamente significativa em relação à presença ou ausência dos alelos mutantes. Os resultados apresentados apontam um aumento de cerca de três vezes no *odds ratio* para o desenvolvimento de LES em pessoas com a presença do alelo D. Nesta população estudada, não foi encontrada associação entre os alelos mutantes e a expressão fenotípica da doença.

## 1 INTRODUÇÃO

A suscetibilidade ao desenvolvimento de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) está relacionada a fatores genéticos e ambientais. Há evidências da participação de múltiplos genes no desencadeamento da doença. Vários genes têm sido relacionados com o aparecimento do LES, incluindo vários *loci* que codificam diferentes componentes do Sistema Complemento (SC) e seus receptores. Deficiências genéticas, especialmente de moléculas da via clássica, são fortemente associadas com o surgimento do LES. A associação da deficiência de C1q, que é um fator de ativação da via clássica do SC, com LES é próxima de 100% e provavelmente se deve ao papel do C1q na depuração de material celular apoptótico. O acúmulo desse material leva à exposição de auto-antígenos que, em determinado momento, quebrando os mecanismos de tolerância imunológica, ativam o sistema imune e desencadeiam a produção de anticorpos auto-reativos. Alguns estudos têm evidenciado um possível papel da lectina ligadora da manose (MBL – *mannose-binding lectin*) na fisiopatogênese do LES. À semelhança de C1q, ela atua na ativação do SC. Vários polimorfismos que determinam baixas concentrações séricas da MBL têm sido associados com predisposição ao LES, além de mostrarem relação com manifestações clínicas e laboratoriais típicas desta doença. No entanto, os resultados de associação ainda apresentam muitas controvérsias. O presente estudo objetiva avaliar a frequência de cinco polimorfismos do gene *MBL-2* (*G57E*, *G54D*, *IVSnt5*, *R52C* e *R52H*) em pacientes com diagnóstico de LES, comparando-os com controles saudáveis, buscando possíveis



associações desses polimorfismos com surgimento do LES e com expressões clínicas e laboratoriais da doença.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CONCEITO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O LES é uma doença inflamatória crônica auto-imune com envolvimento de múltiplos órgãos e sistemas. É caracterizada pela produção de anticorpos auto-reativos e formação de imunocomplexos. Sua etiologia permanece ainda desconhecida, porém sabe-se da importante participação de fatores genéticos e ambientais para o desencadeamento deste desequilíbrio do sistema imunológico. As características clínicas são polimórficas e sua evolução costuma ser crônica, com períodos de exacerbação e remissão. A doença pode cursar com artrite, serosite, glomerulonefrite, vasculite, miosite, manifestações mucocutâneas, hemocitopenias imunológicas, diversos quadros neuropsiquiátricos, hiperatividade retículo-endotelial e pneumonite, entre outros. Diante disso, convencionou-se realizar seu diagnóstico através da associação de achados clínicos e laboratoriais, conforme os critérios de classificação propostos pelo *American College of Rheumatology* (ACR) em 1982 e revisados em 1997, detalhados no anexo I (1-3).

### 2.2 EPIDEMIOLOGIA DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Estudos epidemiológicos envolvendo pacientes com LES são de difícil realização pela variabilidade de apresentações clínicas desta doença, pelo fato do diagnóstico depender da caracterização de determinados sinais e sintomas pré-estabelecidos pelos

critérios de classificação e pela sua baixa freqüência na população. A prevalência relatada de LES na população norte-americana é de cerca de 40-50 casos para cada 100.000 pessoas (4). Estimativas de incidência norte-americana variam aproximadamente de 2 a 8 casos para cada 100.000 pessoas por ano, sendo que nos últimos 40 anos, devido provavelmente à detecção mais precoce da doença, houve um aumento da incidência na ordem de até três vezes (5-7). Um estudo epidemiológico incluindo os Estados Unidos, Ásia, Europa, Martinica e Austrália revelou uma variação de incidência de 1 a 32 casos para cada 100.000 pessoas por ano. A prevalência foi maior nos países europeus quando comparados com os Estados Unidos. Dentre os países europeus, Espanha, Itália e França foram os que tiveram maior prevalência de LES (8). No Brasil, estima-se uma incidência de LES em torno de 8,7 casos para cada 100.000 pessoas por ano, sendo que em mulheres esta estimativa é de 14 casos para cada 100.000 pessoas por ano e em homens é de 2,2 casos para cada 100.000 pessoas por ano. O pico de incidência ocorre em mulheres entre 35 e 39 anos, com 32,7 casos para cada 100.000 mulheres por ano (9).

O LES é mais comumente visto nas mulheres, numa proporção de aproximadamente 9:1, principalmente na idade reprodutiva. Em crianças, essa razão é de 3:1; em adultos jovens chega a 14:1 e nos indivíduos de mais idade, novamente tende a ser menor, em torno de 8:1. Este fato é atribuído a fatores hormonais (10, 11). Nos Estados Unidos, mulheres afro-descendentes apresentam maior prevalência de LES (12). A incidência de LES ajustada para sexo e raça para cada 100.000 pessoas por ano é cerca de 0,4 para homens euro-descendentes, 3,5 para mulheres euro-descendentes, 0,7 para homens afro-descendentes e 9,2 para mulheres afro-

descendentes (13). Em geral, o surgimento da doença ocorre entre 16-55 anos em 65% dos casos, abaixo dos 16 anos em 20% e acima dos 55 anos em 15% dos casos (14, 15).

A sobrevida nos pacientes com LES tem melhorado muito nos últimos anos. Na década de 50, a sobrevida média em cinco anos era de somente 50%, enquanto na última década, a sobrevida média em dez anos alcançou 80 a 90% (16-21). Vários fatores contribuíram para isso, principalmente o melhor entendimento da fisiopatologia da doença e as melhores condições de tratamento, com otimização do uso de glicocorticóides e drogas imunossupressoras, antibioticoterapia, suporte dialítico, transplante renal e melhor manejo dos fatores de risco cardiovasculares (18, 19, 22-24). Mesmo assim, a mortalidade permanece cerca de três a cinco vezes maior em relação à população geral (25). O prognóstico do LES tende a ser menos favorável em afro-descendentes quando comparado com euro-descendentes, assim como em populações com baixo nível sócio-econômico e em crianças de um modo geral (14, 26, 27). Em crianças, a doença costuma ser mais grave, havendo maior incidência de manifestações cutâneas, glomerulonefrite, pericardite, hepatoesplenomegalia e alterações hematológicas (14, 28). Nos homens, o diagnóstico é mais tardio e a mortalidade dentro do primeiro ano da doença é maior (29). No idoso, o surgimento e a evolução da doença assemelham-se ao lúpus induzido por drogas, com maior prevalência de síndrome *sicca*, serosite, envolvimento pulmonar e manifestações músculo-esqueléticas. Há menor freqüência de acometimento neurológico e renal, mesmo assim ocorre diminuição da sobrevida (30-32).

A mortalidade no LES segue um padrão bimodal (33). Precocemente, deve-se à atividade da doença, especialmente quando há acometimento renal e do sistema nervoso central e ao maior risco de infecções graves decorrentes da imunossupressão. Dados de um estudo brasileiro mostraram que até 58% das mortes nos pacientes com LES resultaram de infecções (34). Tardamente, resulta de complicações da própria doença e do tratamento, sendo a doença cardiovascular um dos mais importantes fatores de morbidade e mortalidade nestes pacientes (20, 22-24, 35, 36).

### 2.3 ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

A etiologia do LES permanece pouco conhecida, mas provavelmente é multifatorial, envolvendo fatores genéticos, imunológicos, hormonais e ambientais. A participação de agentes infecciosos, algumas drogas, radiação solar e hormônios, atuando em um indivíduo geneticamente predisposto, proporciona o reconhecimento anormal de auto-antígenos pelo sistema imune e a perda da tolerância imunológica que está associada à falha nos mecanismos supressores e de imunorregulação, com subsequente ativação policlonal de linfócitos B e produção de auto-anticorpos. A formação e deposição de imunocomplexos com ativação do complemento e conseqüente processo inflamatório, desencadeiam lesão tecidual. Exemplo disto é o acometimento renal nos pacientes com glomerulonefrite lúpica. Auto-anticorpos dirigidos contra membranas celulares contribuem para as citopenias (anemia hemolítica, leucopenia, linfopenia e trombocitopenia), além de outras manifestações detectadas na doença, como o envolvimento do sistema nervoso central. Auto-anticorpos dirigidos contra o complexo fosfolípide-beta-2-glicoproteína I são

responsáveis por eventos tromboembólicos venosos e arteriais observados em pacientes com LES. A injúria celular promovida por auto-anticorpos e ativação do SC com inflamação crônica predispõem ao surgimento de novos auto-antígenos, que mantém a estimulação da resposta imunológica, levando a uma perpetuação da resposta auto-imune.

A predisposição ao LES pode estar relacionada à herança de determinados genes localizados em regiões cromossômicas específicas. Ao contrário de muitas doenças genéticas, onde o padrão de herança é definido como autossômico recessivo, autossômico dominante ou ligado ao sexo, no LES, o padrão de herança não segue um modelo monoalélico. Estudos mostraram altas taxas de concordância para a doença em gêmeos monozigóticos, que podem variar de 14 a 57%, enquanto que nos dizigóticos não ultrapassa 2 a 3% (37, 38). Cinco a 12% dos familiares de pacientes com LES terão a doença, o que representa um risco 100 vezes maior do que a população geral (39). Crianças nascidas de mães com LES têm teste positivo para fator antinuclear em cerca de 27% dos casos, sem necessariamente desenvolver quadro clínico compatível (40). O encontro de outras doenças auto-imunes em familiares de pacientes com LES e sua associação com outros distúrbios geneticamente determinados, também reforçam a importância da predisposição genética para o surgimento da doença. Aparentemente, uma combinação de fatores genéticos, tanto a presença de genes de susceptibilidade quanto a ausência de genes de proteção, é requerida para atingir risco suficiente para o surgimento da doença.

Alguns marcadores genéticos são mais comuns nos pacientes com LES do que na população geral (41-51). Muitos estudos de rastreamento de ligação genética têm sido realizados e uma meta-análise mostrou três regiões mais consistentemente

relacionadas com LES: 6p21.1-q15, 20p11-q13.13 e 16p13-q12.2. (52). Dentre os alelos do complexo maior de histocompatibilidade, destacam-se o HLA-B8, HLA-DR2, HLA-DR3, DQW1 e HLA-DMA\*O401. Deficiências de componentes do SC como C2, C1q, C4 (especialmente C4A), do receptor do complemento-1 (CR1) e da MBL têm sido encontradas. Há descrição de outros defeitos como nos alelos do receptor Fc (especialmente o alelo nulo da FcIIIB), diversos polimorfismos genéticos de citocinas e receptores de citocinas, alelo nulo do gene da enzima glutationa S-transferase que causa sua deficiência, atividade anormal de proteinoquinases, fosfatases e moléculas de sinalização intracelular, dentre elas a proteína tirosina fosfatase N22 (PTPN22 - *protein tyrosine phosphatase N22*) e níveis anormais de opsoninas, citocinas e quimiocinas, destacando-se o aumento da proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1 - *monocyte chemoattractant protein-1*). No que se refere principalmente à associação de LES com haplótipos do HLA, verifica-se muita variação dessas associações nas diferentes populações estudadas, sendo alguns haplótipos vistos com maior frequência em alguns grupos populacionais, mas não em outros. Todos estes fatores potencialmente podem alterar a regulação imune, a degradação de proteínas, o transporte de peptídeos através da membrana celular, a cascata do SC, o funcionamento do sistema reticuloendotelial, a produção de imunoglobulinas, a apoptose e a produção e liberação de hormônios (53). A combinação destas diferentes alterações pode levar a respostas imunológicas anormais que, aliadas a fatores ambientais, podem resultar em múltiplos processos fisiopatológicos e variadas expressões clínicas da doença.

Os hormônios têm função imunorregulatória e alteração em suas concentrações pode ter um papel na patogênese no LES, influenciando na incidência e no curso clínico

da doença (54, 55). O estrogênio estimula timócitos, linfócitos T CD8+ e CD4+, linfócitos B, macrófagos, liberação de citocinas e a expressão de moléculas do HLA, tanto de classe I quanto de classe II e moléculas de adesão endotelial (56). Os androgênios tendem a ser imunossupressores (57). O desequilíbrio entre níveis de estrogênio e androgênio parece então influenciar a resposta imune. Isto justifica, em parte, a maior freqüência de LES em mulheres na idade reprodutiva, o início da doença durante a gestação e sua maior freqüência em indivíduos com síndrome de Klinefelter (11). Costenbader *et al.*, estudando uma coorte de mulheres do *Nurse's Health Study*, encontraram que exposição estrogênica, incluindo menarca precoce e uso de estrogênio exógeno através de contraceptivos orais ou terapia de reposição hormonal na pós-menopausa, aumentam significativamente o risco de LES (58). Outras alterações hormonais também são descritas no LES. A progesterona diminui a proliferação de células T e aumenta o número de células CD8+ (59). Em pacientes com LES, há evidências de baixos níveis de progesterona, podendo resultar em possível fator predisponente para a doença (60). A prolactina encontra-se elevada em situações de reativação do LES (61). Ocorre também aumento de doença tireoideana auto-imune em pacientes com LES, o que altera os níveis dos hormônios tireóideos e do hormônio tireoestimulante (62, 63).

Nos pacientes com LES há numerosas anormalidades na regulação do sistema imune que podem desencadear a perda da autotolerância. Isto leva ao reconhecimento de auto-antígenos, ativação imunológica de linfócitos T e B com secreção de citocinas, principalmente interleucinas (IL) 4, 6 e 10, proliferação e diferenciação de linfócitos B e conseqüente produção de anticorpos auto-reativos (64). Várias anormalidades têm sido descritas, dentre elas a diminuição dos linfócitos T supressores e linfócitos T citotóxicos



(65); defeitos na atividade citolítica dos linfócitos T (66); aumento dos linfócitos T *helper* CD4+, caracterizando uma resposta imunológica predominantemente do tipo Th-2 (67); ativação policlonal precoce de linfócitos B e defeitos na tolerância destes linfócitos (65, 68-70); sinalização disfuncional das células do sistema imune caracterizada por aumento da resposta ao cálcio intracelular, hiperfosforilação de proteínas citosólicas e diminuição do fator nuclear *kappa* beta (71, 72); aumento do microquimerismo fetal (73); elevação dos níveis circulantes de interferon alfa e aumento da expressão da transcrição do RNA indutor de interferon alfa pelas células mononucleares (74-77), além de aumento de C4d e diminuição de CR-1 na superfície eritrocitária (78). Recentemente, foi descrita uma relação dos receptores *toll like* (TLR – *toll-like receptors*) com o reconhecimento de auto-antígenos e produção de auto-anticorpos. No LES em atividade, foi encontrado aumento da proporção de células B de memória e células plasmáticas expressando TLR-9, evidenciando uma possível contribuição destes receptores na patogênese do LES (79). Defeitos na apoptose com expressão de auto-antígenos nucleares na superfície da célula, associados com uma depuração ineficaz de material apoptótico, secundário a deficiências do complemento e alterações na função dos macrófagos, levam à estimulação continuada do sistema imune (80). Conseqüentemente, ocorre quebra dos mecanismos de auto-tolerância e produção de anticorpos auto-reativos.

Vários fatores ambientais têm sido associados ao desenvolvimento do LES. Infecções causadas por vírus, dentre eles o vírus Epstein-Barr, poderiam contribuir para o desenvolvimento de auto-imunidade, principalmente por mimetismo molecular (81). Outros vírus, como Citomegalovírus, Parvovírus B19 e alguns retrovírus, também foram associados ao desenvolvimento do LES, porém as evidências são controversas.

Infecções como tripanossomíase e micobacteriose podem induzir a produção de anticorpos contra DNA e sintomas semelhantes ao LES (71, 82). Raios ultravioletas podem estimular os queratinócitos a expressarem antígenos nucleares em sua superfície e aumentar a secreção de citocinas que estimulam linfócitos B à produção de anticorpos auto-reativos (83, 84). Fatores de exposição ambiental como pó de sílica e tabagismo foram encontrados em maior prevalência em pacientes com LES, sugerindo uma possível associação destes com a doença (10, 85-87). Pacientes com LES têm relato de aumento de reações alérgicas a medicamentos, principalmente antibióticos (88). Algumas drogas, como procainamida, hidralazina e isoniazida desencadeiam um quadro conhecido como lúpus induzido por drogas, que é caracterizado pelo surgimento de manifestações clínicas após exposição a essas drogas ou outras menos freqüentes, sendo que após a suspensão das mesmas, há completo desaparecimento das alterações clínicas e laboratoriais.

## 2.4 SISTEMA COMPLEMENTO

O SC é parte do sistema imune inato, é composto por mais de 20 diferentes proteínas e tem papel central na resposta inflamatória. O SC é importante para a destruição de microorganismos através da opsonização, ativação leucocitária e lise de células-alvo, sendo responsável pela remoção de complexos imunes e estimulando a resposta de anticorpos. Pode ser ativado por três diferentes vias: via clássica, via alternativa e via da lectina. A via clássica é dependente de anticorpos, sendo ativada por complexos imunes com IgG (exceto IgG4) e IgM, que se ligam através da porção Fc

a domínios de C1q. A via alternativa é formada por seis proteínas (C3, fator B, fator D, fator H, fator I e properdina), caracterizando-se por um estado de constante ativação e podendo ser desencadeada diretamente por microorganismos e células anormais. A via da lectina é ativada pela ligação da MBL ao grupamento manose terminal da superfície de certas bactérias, desencadeando eventos semelhantes aos que ocorrem na via clássica. As três vias convergem para a geração de C3b convertase que cliva C3, produzindo a forma ativada C3b. A ligação de C3b à C3 convertase gera um complexo trimolecular capaz de ligar e clivar C5. Este complexo inicia a via terminal do complemento, que resulta na formação do complexo de ataque à membrana, cuja ação é alterar a integridade da membrana celular ocasionando a lise. Além disso, C3b em conjunto com C4b atua nos processos de opsonização, enquanto C3a e C5a atuam como mediadores inflamatórios.

Deficiências herdadas e adquiridas do SC estão associadas com algumas doenças auto-imunes e também com infecções de repetição por determinados microorganismos. Deficiências de componentes da via clássica (C1q, C1r, C1s, C4 e C2) têm associação com LES (89). Deficiências de componentes da via alternativa (principalmente C3) mostram associação com infecções por germes encapsulados (*Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*) (90). Deficiências de componentes terminais do SC (C5, C6, C7, C8 e C9) aumentam consideravelmente a suscetibilidade para infecções por *Neisseria*. Deficiências da MBL estão associadas com infecções recorrentes em adultos e crianças e, segundo alguns autores, com aumento no risco de desenvolvimento do LES (91). Outras deficiências adquiridas podem ser vistas em algumas doenças como glomerulonefrite membranoproliferativa tipo II e pós-estreptocócica (diminuição de C3), LES,

crioglobulinemia mista essencial, vasculite reumatóide, síndrome de Felty, infecções crônicas e vasculite urticariforme hipocomplementêmica.

## 2.5 LECTINA LIGADORA DA MANOSE E LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

A MBL é uma proteína que pertence à superfamília das colectinas, onde o domínio lectina está associado com uma estrutura de colágeno. Tem formato de “buquê”, assemelhando ao formato de C1q. É formada por três cadeias polipeptídicas de 32 kDa, cada uma com um domínio lectina, uma região hidrofóbica alfa-hélice, uma região de colágeno e uma região N-terminal rica em cisteína (92, 93). Atua de forma semelhante à C1q, ligando-se ao grupamento manose terminal da superfície de vários microorganismos e ativando o SC através da interação com 2 esterases, MASP (MBL-associated serine proteases) 1 e 2 que são homólogas a C1r e C1s da via clássica do SC, resultando na clivagem de C4 e C3 (94, 95).

Em humanos, o gene que codifica a MBL é conhecido como *MBL-2* e é formado por quatro exons e três íntrons, estando localizado no cromossomo 10 (96). O exon 1 codifica o peptídeo sinalizador, uma região rica em cisteína e parte da região do colágeno rico em glicina. O exon 2 codifica o restante da região do colágeno. O exon 3 codifica a região alfa-hélice e o exon 4 codifica o domínio de reconhecimento do carboidrato C-terminal (92, 93). Vários polimorfismos localizados neste gene têm sido identificados, resultando principalmente na deficiência de MBL. Três mutações pontuais foram descritas nos códons 52, 54 e 57 do exon 1. Respectivamente, são referidas como variantes alélicas D (mutação C→T), B (mutação G→A) e C (mutação G→A). A

variante A é descrita como alelo selvagem (caracteriza-se pela ausência das variantes de mutação simultaneamente nos três códons), sendo encontrado na grande maioria das pessoas. A variante O refere-se à presença de qualquer um dos três polimorfismos encontrados no exon 1. Essas mutações causam alterações estruturais que determinam baixos níveis séricos da MBL (97-99). Em homocigotos ou heterocigotos compostos para estas variantes alélicas, praticamente nenhuma proteína é detectada. Nos heterocigotos com a presença de um dos alelos B ou C, o efeito em diminuir os níveis séricos é maior do que com a presença de um alelo D (97). O alelo B ocorre em aproximadamente 26% dos indivíduos euro-descendentes, enquanto o alelo C ocorre entre 50% e 60% dos indivíduos afro-descendentes (98). Estas frequências, no entanto, podem variar muito dependendo da população estudada. O alelo D geralmente é o menos prevalente nos estudos realizados (100). Na região promotora do gene foram identificados três polimorfismos nas posições -550 (mutação G→C), -221 (mutação G→C) e +4 (mutação C→T), respectivamente variantes alélicas H/L, Y/X e P/Q (101). Quatro haplótipos promotores são comumente encontrados: LXP, LYP, LYQ e HYP. Destes, o HYP é o único associado com níveis aumentados de MBL, enquanto o haplótipo LXP é encontrado em associação com deficiência de MBL e os haplótipos LY associam-se com níveis séricos intermediários de MBL (102). O haplótipo HXP até o momento não foi identificado de forma inequívoca. Somente um estudo, conduzido por Navarra *et al.*, descreveu cerca de 22% de frequência do haplótipo HX em pacientes filipinos com LES (103), porém Chies alertou para a divergência destes dados em relação aos estudos prévios (104). Estes haplótipos promotores estão em forte desequilíbrio de ligação com mutações do exon 1, resultando em 7 haplótipos extendidos, chamados HYP A, LYP A, LYQ A, LXPA, HYP D, LYP B e LYQ C. Vários outros

polimorfismos têm sido descritos, ainda sem significado clínico bem definido. Um exemplo é o polimorfismo envolvendo a mutação G→A na posição 5 do primeiro íntron (alelo *IVSnt5*), descrita inicialmente em uma população de pacientes afro-descendentes com anemia falciforme. Este polimorfismo apresenta ligação de desequilíbrio com o haplótipo LY da região promotora e está relacionado com níveis séricos de MBL mais baixos do que em relação ao haplótipo HY (105). Outro exemplo é a descrição de um segundo polimorfismo envolvendo o códon 52 (mutação G→A na segunda posição do códon) que foi inicialmente descrita em indivíduos afro-descendentes, sendo conhecido como alelo *R52H* e até o momento não tem relação estabelecida com níveis séricos de MBL (106).

Além de vários relatos da associação da deficiência de MBL com infecções, há vários estudos mostrando uma possível relação com suscetibilidade a doenças auto-imunes. Há evidências da associação com LES, como foram inicialmente vistos em alguns estudos. Em 1995, Davis *et al.*, estudando pacientes euro-descendentes com LES, encontraram uma frequência de 41% versus 30% nos controles, do alelo B, porém esta diferença não era estatisticamente significativa (107). O mesmo autor, três anos mais tarde, verificou em pacientes afro-descendentes que pelo menos um alelo (B ou C) era encontrado mais frequentemente em pacientes com LES (60% versus 42% nos controles), porém novamente a diferença não apresentava-se estatisticamente significativa, com *odds ratio* (OR) de 1,7 e intervalo de confiança (IC) 95%=0,8-3,6. As frequências dos alelos C e B foram respectivamente 54% e 15% nos pacientes e 45% e 11% nos controles (108). Lau *et al.*, em 1996, estudando pacientes chineses, encontraram uma frequência de 0,33 versus 0,23 nos controles, do alelo B, porém não estatisticamente significativa (OR de 1,7 e IC95%=0,95-3,02). Despertou atenção o fato

de dois dos 37 pacientes lúpicos estudados serem homocigotos para o alelo B (109). Sullivan *et al.*, em 1996, mostraram uma maior frequência do alelo B (0,163 versus 0,087 com  $p < 0,05$ ) e C (0,125 versus 0,047 com  $p < 0,05$ ) em pacientes afro-descendentes norte-americanos com LES (110). Em 2003, os mesmos autores encontraram aumento significativo da frequência do alelo C em pacientes euro-descendentes e aumento da frequência do alelo B e de haplótipos da região promotora em pacientes afro-descendentes (111). Villarreal *et al.*, estudando pacientes espanhóis euro-descendentes, encontraram uma frequência estatisticamente significativa do alelo B de 2,2 vezes maior nos pacientes com LES do que nos controles. As frequências dos alelos B, C e D foram respectivamente 30,8%, 5% e 10,8% nos pacientes e 16,7%, 2,2% e 12,3% nos controles. Houve uma prevalência muito baixa do alelo C nesta população (112). Carthy *et al.* encontraram OR de 1,9 ( $p = 0,038$ ) para presença do alelo B em pacientes euro-descendentes na Grécia (113). Takahashi *et al.*, estudando uma população asiática, encontraram homocigose para o alelo B em 6% dos pacientes, frequência essa significativamente mais alta que nos controles (114). Garred *et al.*, em 2001, observaram um aumento estatisticamente significativo na presença dos genótipos A/O e O/O, quando comparados com o genótipo A/A, em casos e controles, além de um risco maior de infecções nos pacientes com LES. Também conduziram uma meta-análise que evidenciou um OR de 1,6 (IC95%=1,3 – 2,0) para a presença dos genótipos A/O e O/O nos pacientes com LES (115). Lee *et al.* publicaram uma meta-análise que avaliou vários estudos de polimorfismos da MBL no LES, com diferentes populações, mostrando que os alelos B e os localizados na região promotora (-550 e -221) são fatores de risco para LES, com um OR respectivamente de 1,40, 1,48 e 1,22 ( $p < 0,05$ ). Não se conseguiu, contudo, evidenciar diferença significativa da frequência de vários

polimorfismos do gene da MBL em duas coortes de pacientes lúpicos (116). Em 2007, Navarra *et al.* mostraram uma tendência de maior frequência do haplótipo LX em pacientes com LES (30,4% versus 23,9%) (103). Os mesmos autores também reportaram uma incomum elevação da frequência do haplótipo HX nesta população, como foi apontado por Chies (104). Todos estes resultados sugerem que a MBL confere uma proteção contra o LES semelhante àquela conferida pelo C1q, porém com um efeito mais fraco, e que sua deficiência pode relacionar-se com surgimento da doença.

Alguns autores tentam evidenciar se os diferentes polimorfismos do gene da MBL têm alguma influência nas características clínicas e laboratoriais da doença. Takahashi *et al.* não observaram diferença estatística nas alterações fenotípicas e imunológicas estudando o alelo B, porém observaram maior número de infecções e discreta diminuição de C3 e CH50 nos pacientes com homozigose para este polimorfismo (114). Mok *et al.* sugerem que baixos níveis de MBL relacionam-se com maior risco de infecção em pacientes chineses com LES (117), no entanto, esta relação não foi encontrada por Bultink *et al.* (118). A relação entre o maior número de infecções em pacientes que apresentam alelos mutantes ainda é muito controversa. Outros estudos tentaram correlacionar os polimorfismos com eventos cardiovasculares. Font *et al.* observaram que pacientes com o genótipo associado com deficiência de MBL têm um OR de 3,1 para ter doença cardiovascular. Estes pacientes, no entanto, também tinham maior prevalência de anticorpos antifosfolípidos, o que pode ter sido um fator de confusão (119). Ohlenschlaeger *et al.* correlacionaram de maneira significativa, variantes alélicas para deficiência de MBL com risco aumentado de trombose arterial (120). Calvo-Alen *et al.* encontraram relação entre variantes alélicas da MBL com



doença cerebrovascular em pacientes euro-descendentes com LES, sugerindo que a influência destes alelos sobre doenças tromboembólicas ocorra em determinados grupos étnicos (121). Estudo com mulheres lúpicas das Ilhas Canárias não evidenciou a deficiência de MBL como fator de risco, mas correlacionou com baixa frequência de anticorpos auto-reativos e surgimento mais tardio da doença (122). Bertoli *et al.* publicaram estudo de pacientes norte-americanos, mostrando que os alelos mutantes da MBL correlacionam-se com menor probabilidade de serosite (56% versus 65%, com  $p=0,0506$ ), envolvimento renal (45% versus 55%, com  $p=0,479$ ) e anticorpos antifosfolípidos (27% versus 36%, com  $p=0,496$ ), enquanto apresentam maior risco de leucopenia (63% versus 51%, com  $p=0,0125$ ) (123). Piao *et al.* encontraram uma prevalência significativamente maior da presença do anticorpo anti-Sm associado com genótipos A/B e A/C em pacientes lúpicos norte-americanos. No mesmo estudo, os autores concluíram que variantes alélicas mutantes em homozigose parecem modificar o curso da doença, havendo maior frequência de acometimento renal (124). Recentemente, Jakab *et al.*, estudando pacientes lúpicos chineses, encontraram um significativo aumento na frequência de LES de início precoce ( $\leq 20$  anos) entre os homozigotos XA/XA (17,4%) quando comparado com os demais pacientes (5,6%). Esses pacientes também apresentaram significativamente maior prevalência de manifestações cutâneas e serosite (125). Diante dos diferentes resultados encontrados por vários autores em populações distintas, percebe-se que a influência das variantes alélicas do gene *MBL-2* na expressão fenotípica do LES depende da interação com outros fatores genéticos e, possivelmente, ambientais.

Outro fator interessante é a presença de anticorpos anti-MBL em pacientes com deficiência de MBL. Isto poderia explicar a existência da deficiência de MBL na

ausência de anormalidades genéticas e auxiliaria no entendimento da variação das concentrações séricas de MBL em pacientes com a mesma mutação genética. Os resultados de alguns estudos, no entanto, têm sido controversos. Anticorpos anti-MBL podem ligar-se à MBL, diminuindo seus níveis séricos e ocasionando depósito destes imunocomplexos nos tecidos, o que contribuiria para lesão em órgão alvo. Seelen *et al.*, primeiramente demonstraram a presença de anticorpos anti-MBL em pacientes com LES, mas não encontraram associação com níveis baixos de MBL. Os autores deste estudo sugerem um possível efeito destes anticorpos na atividade funcional da MBL circulante (126). Takahashi *et al.* evidenciaram que os títulos de anticorpos anti-MBL em pacientes chineses com LES foram maiores que nos controles saudáveis, apesar disso não houve associação entre os títulos de anti-MBL com genótipos do gene *MBL-2* (alelo B), concentrações séricas da MBL ou características clínicas da doença (127). Mok *et al.* encontraram IgG anti-MBL em 23,7% dos pacientes com LES e 10% dos controles saudáveis ( $p=0,04$ ). Níveis séricos de IgG anti-MBL tiveram correlação positiva com níveis de séricos de MBL nestes pacientes. Anti-MBL IgM foi encontrado em uma pequena fração dos pacientes, sugerindo que a produção de anti-MBL no LES possa ser um processo voltado para antígeno específico e não resultado de ativação policlonal, na qual seria esperada produção de anticorpos IgM. Os níveis de anti-MBL, no entanto, não tiveram correlação com a atividade global da doença (128). Shoenfeld *et al.* identificaram elevação dos títulos de anti-MBL em pacientes com LES em remissão e os autores sugerem que estes anticorpos possam ter papel patogênico no desenvolvimento e na perpetuação da auto-imunidade no LES (129). No entanto, o significado real do anticorpo anti-MBL no LES ainda permanece incerto e necessita de maiores esclarecimentos.

Ambos os tipos de polimorfismos, estrutural e promotor, relacionados com baixos níveis séricos de MBL, estão aumentados em pacientes com LES de diferentes origens étnicas. A falha de alguns estudos em evidenciar diferenças significativas pode ser decorrente do número pequeno de pacientes, determinando um baixo poder estatístico ou por diferenças étnicas entre as várias populações estudadas. A influência destes polimorfismos em determinados grupos étnicos pode ser seletiva, havendo diferenças quanto à magnitude do risco relativo, dependendo da população avaliada. Diante desta grande variabilidade genética dos polimorfismos da MBL que é inerente à etnicidade, a tentativa de evidenciar diferenças significativas, quanto ao real risco das mutações alélicas da MBL no surgimento de LES, através do agrupamento de dados de diferentes populações, fica prejudicada. Isto porque a ancestralidade genética divergente entre as populações pode comprometer a fidedignidade dos resultados obtidos. Além da predisposição ao LES, a MBL pode estar relacionada com algumas expressões fenotípicas próprias da doença ou mesmo eventos cardiovasculares. Neste sentido, a variabilidade dos dados encontrados é muito grande, com autores mostrando ou não certas associações. Novamente, a variabilidade étnica das populações pode contribuir para estes achados. A existência de uma seletividade fenotípica relacionada com diferentes variações alélicas pode ajudar a explicar parte dessa variabilidade. A interação entre os diferentes polimorfismos e destes com outros genes, em um mesmo indivíduo, pode fazer com que uma expressão fenotípica possa ser mais ou menos presente, assim como influenciar a gravidade desta apresentação.

Os diferentes mecanismos envolvidos na etiopatogênese do LES estão sendo conhecidos gradualmente. A influência genética é apenas uma pequena parte deste complexo emaranhado de fatores que atuam em conjunto, não somente para

desencadeamento da doença, mas também para determinar a forma de evolução e o prognóstico. O avanço no entendimento do papel das diferentes variantes alélicas da MBL certamente contribuirá para maiores esclarecimentos sobre a etiopatogenia da doença. Em decorrência do maior impacto das variantes alélicas encontradas na região do exon 1 do gene *MBL-2* na diminuição dos níveis séricos da MBL, acredita-se na possibilidade destas variantes estarem associadas com o desenvolvimento do LES de forma mais significativa, justificando a realização deste trabalho que objetiva avaliar o papel dos polimorfismos *G57E*, *G54D*, *IVSnt5*, *R52C* e *R52H* nesta doença.

### 3 OBJETIVOS

1- Estudar a frequência dos polimorfismos *G57E*, *G54D*, *IVSnt5*, *R52C* e *R52H* do gene *MBL-2* em uma população de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico e comparar com controles saudáveis.

2- Avaliar as possíveis associações dos polimorfismos *G57E*, *G54D*, *IVSnt5*, *R52C* e *R52H* do gene *MBL-2* com expressões clínicas e laboratoriais em uma população de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico.

## 4 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997 Sep;40(9):1725.
2. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982 Nov;25(11):1271-7.
3. Edworthy SM, Zatarain E, McShane DJ, Bloch DA. Analysis of the 1982 ARA lupus criteria data set by recursive partitioning methodology: new insights into the relative merit of individual criteria. *J Rheumatol.* 1988 Oct;15(10):1493-8.
4. Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum.* 1998 May;41(5):778-99.
5. Fessel WJ. Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women. *Arch Intern Med.* 1974 Dec;134(6):1027-35.
6. Uramoto KM, Michet CJ, Jr., Thumboo J, Sunku J, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis Rheum.* 1999 Jan;42(1):46-50.
7. Michet CJ, Jr., McKenna CH, Elveback LR, Kaslow RA, Kurland LT. Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. *Mayo Clin Proc.* 1985 Feb;60(2):105-13.
8. Danchenko N, Satia JA, Anthony MS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. *Lupus.* 2006;15(5):308-18.
9. Vilar MJ, Sato EI. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus.* 2002;11(8):528-32.

10. Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Parks CG, Gilkeson GS. Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1998 Oct;41(10):1714-24.
11. Lahita RG. The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 1999 Sep;11(5):352-6.
12. Hochberg MC. The incidence of systemic lupus erythematosus in Baltimore, Maryland, 1970-1977. *Arthritis Rheum.* 1985 Jan;28(1):80-6.
13. McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA, Jr., Ramsey-Goldman R, LaPorte RE, Kwoh CK. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum.* 1995 Sep;38(9):1260-70.
14. Schaller J. Lupus in childhood. *Clin Rheum Dis.* 1982 Apr;8(1):219-28.
15. Ballou SP, Khan MA, Kushner I. Clinical features of systemic lupus erythematosus: differences related to race and age of onset. *Arthritis Rheum.* 1982 Jan;25(1):55-60.
16. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore).* 2003 Sep;82(5):299-308.
17. Kasitanon N, Magder LS, Petri M. Predictors of survival in systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore).* 2006 May;85(3):147-56.
18. Boumpas DT, Fessler BJ, Austin HA, 3rd, Balow JE, Klippel JH, Lockshin MD. Systemic lupus erythematosus: emerging concepts. Part 2: Dermatologic and joint disease, the antiphospholipid antibody syndrome, pregnancy and hormonal therapy, morbidity and mortality, and pathogenesis. *Ann Intern Med.* 1995 Jul 1;123(1):42-53.
19. Hochberg MC. Systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am.* 1990 Aug;16(3):617-39.
20. Pistiner M, Wallace DJ, Nessim S, Metzger AL, Klinenberg JR. Lupus erythematosus in the 1980s: a survey of 570 patients. *Semin Arthritis Rheum.* 1991 Aug;21(1):55-64.

21. Tucker LB, Menon S, Schaller JG, Isenberg DA. Adult- and childhood-onset systemic lupus erythematosus: a comparison of onset, clinical features, serology, and outcome. *Br J Rheumatol*. 1995 Sep;34(9):866-72.
22. Boumpas DT, Austin HA, 3rd, Fessler BJ, Balow JE, Klippel JH, Lockshin MD. Systemic lupus erythematosus: emerging concepts. Part 1: Renal, neuropsychiatric, cardiovascular, pulmonary, and hematologic disease. *Ann Intern Med*. 1995 Jun 15;122(12):940-50.
23. Jonsson H, Nived O, Sturfelt G. Outcome in systemic lupus erythematosus: a prospective study of patients from a defined population. *Medicine (Baltimore)*. 1989 May;68(3):141-50.
24. Swaak AJ, Nossent JC, Smeenk RJ. Prognostic factors in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 1991;11(3):127-32.
25. Abu-Shakra M, Urowitz MB, Gladman DD, Gough J. Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. I. Causes of death. *J Rheumatol*. 1995 Jul;22(7):1259-64.
26. Callahan LF, Pincus T. Associations between clinical status questionnaire scores and formal education level in persons with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1990 Mar;33(3):407-11.
27. Ward MM, Studenski S. Clinical manifestations of systemic lupus erythematosus. Identification of racial and socioeconomic influences. *Arch Intern Med*. 1990 Apr;150(4):849-53.
28. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)*. 1993 Mar;72(2):113-24.
29. Ward MM, Studenski S. Systemic lupus erythematosus in men: a multivariate analysis of gender differences in clinical manifestations. *J Rheumatol*. 1990 Feb;17(2):220-4.
30. Boddaert J, Huong DL, Amoura Z, Wechsler B, Godeau P, Piette JC. Late-onset systemic lupus erythematosus: a personal series of 47 patients and pooled analysis of 714 cases in the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2004 Nov;83(6):348-59.



31. Bertoli AM, Alarcon GS, Calvo-Alen J, Fernandez M, Vila LM, Reveille JD. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort. XXXIII. Clinical [corrected] features, course, and outcome in patients with late-onset disease. *Arthritis Rheum*. 2006 May;54(5):1580-7.
32. Ward MM, Polisson RP. A meta-analysis of the clinical manifestations of older-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1989 Oct;32(10):1226-32.
33. Urowitz MB, Bookman AA, Koehler BE, Gordon DA, Smythe HA, Ogryzlo MA. The bimodal mortality pattern of systemic lupus erythematosus. *Am J Med*. 1976 Feb;60(2):221-5.
34. Iriya SM, Capelozzi VL, Calich I, Martins MA, Lichtenstein A. Causes of death in patients with systemic lupus erythematosus in Sao Paulo, Brazil: a study of 113 autopsies. *Arch Intern Med*. 2001 Jun 25;161(12):1557.
35. Chogle AR, Chakravarty A. Cardiovascular events in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis : emerging concepts, early diagnosis and management. *J Assoc Physicians India*. 2007 Jan;55:32-40.
36. Manzi S, Selzer F, Sutton-Tyrrell K, Fitzgerald SG, Rairie JE, Tracy RP, et al. Prevalence and risk factors of carotid plaque in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1999 Jan;42(1):51-60.
37. Block SR, Winfield JB, Lockshin MD, D'Angelo WA, Weksler ME, Fotino M, et al. Proceedings: Twin studies in systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum*. 1975 May-Jun;18(3):285.
38. Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1992 Mar;35(3):311-8.
39. Arnett FC, Reveille JD, Wilson RW, Provost TT, Bias WB. Systemic lupus erythematosus: current state of the genetic hypothesis. *Semin Arthritis Rheum*. 1984 Aug;14(1):24-35.
40. Murashima A, Fukazawa T, Hirashima M, Takasaki Y, Oonishi M, Niiijima S, et al. Long term prognosis of children born to lupus patients. *Ann Rheum Dis*. 2004 Jan;63(1):50-3.

41. Kaufman KM, Kelly JA, Herring BJ, Adler AJ, Glenn SB, Namjou B, et al. Evaluation of the genetic association of the PTPN22 R620W polymorphism in familial and sporadic systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006 Aug;54(8):2533-40.
42. Yang Y, Lhotta K, Chung EK, Eder P, Neumair F, Yu CY. Complete complement components C4A and C4B deficiencies in human kidney diseases and systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2004 Aug 15;173(4):2803-14.
43. Croker JA, Kimberly RP. Genetics of susceptibility and severity in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 2005 Sep;17(5):529-37.
44. Fraser PA, Ding WZ, Mohseni M, Treadwell EL, Dooley MA, St Clair EW, et al. Glutathione S-transferase M null homozygosity and risk of systemic lupus erythematosus associated with sun exposure: a possible gene-environment interaction for autoimmunity. *J Rheumatol.* 2003 Feb;30(2):276-82.
45. Graham RR, Kozyrev SV, Baechler EC, Reddy MV, Plenge RM, Bauer JW, et al. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2006 May;38(5):550-5.
46. Illei GG, Tackey E, Lapteva L, Lipsky PE. Biomarkers in systemic lupus erythematosus. I. General overview of biomarkers and their applicability. *Arthritis Rheum.* 2004 Jun;50(6):1709-20.
47. Kyogoku C, Tsuchiya N, Wu H, Tsao BP, Tokunaga K. Association of Fcγ receptor IIA, but not IIB and IIIA, polymorphisms with systemic lupus erythematosus: A family-based association study in Caucasians. *Arthritis Rheum.* 2004 Feb;50(2):671-3.
48. Morel J, Simoes Cda S, Avinens O, Sany J, Combe B, Eliaou JF. Polymorphism of HLA-DMA and DMB alleles in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2003 Jul;30(7):1485-90.
49. Tsao BP. Update on human systemic lupus erythematosus genetics. *Curr Opin Rheumatol.* 2004 Sep;16(5):513-21.
50. Lazarus M, Hajeer AH, Turner D, Sinnott P, Worthington J, Ollier WE, et al. Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1997 Dec;24(12):2314-7.

51. Schur PH. Genetics of systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 1995 Dec;4(6):425-37.
52. Forabosco P, Gorman JD, Cleveland C, Kelly JA, Fisher SA, Ortmann WA, et al. Meta-analysis of genome-wide linkage studies of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*. 2006 Oct;7(7):609-14.
53. Theofilopoulos AN. The basis of autoimmunity: Part II. Genetic predisposition. *Immunol Today*. 1995 Mar;16(3):150-9.
54. Li J, May W, McMurray RW. Pituitary hormones and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2005 Dec;52(12):3701-12.
55. McMurray RW, May W. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis Rheum*. 2003 Aug;48(8):2100-10.
56. Cutolo M, Sulli A, Serio B, Accardo S, Masi AT. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol*. 1995 Mar-Apr;13(2):217-26.
57. Lahita RG. Sex hormones and the immune system--Part 1. Human data. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1990 Apr;4(1):1-12.
58. Costenbader KH, Feskanich D, Stampfer MJ, Karlson EW. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum*. 2007 Apr;56(4):1251-62.
59. Clemens LE, Siiteri PK, Stites DP. Mechanism of immunosuppression of progesterone on maternal lymphocyte activation during pregnancy. *J Immunol*. 1979 May;122(5):1978-85.
60. Arnalich F, Benito-Urbina S, Gonzalez-Gancedo P, Iglesias E, de Miguel E, Gijon-Banos J. Inadequate production of progesterone in women with systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol*. 1992 Apr;31(4):247-51.
61. Blanco-Favela F, Quintal-Alvarez G, Leanos-Miranda A. Association between prolactin and disease activity in systemic lupus erythematosus. Influence of statistical power. *J Rheumatol*. 1999 Jan;26(1):55-9.

62. Goh KL, Wang F. Thyroid disorders in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 1986 Jul;45(7):579-83.
63. Weetman AP, Walport MJ. The association of autoimmune thyroiditis with systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol*. 1987 Oct;26(5):359-61.
64. Elkon K. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 1995 Sep;7(5):384-8.
65. Klinman DM, Steinberg AD. Inquiry into murine and human lupus. *Immunol Rev*. 1995 Apr;144:157-93.
66. Stohl W. Impaired polyclonal T cell cytolytic activity. A possible risk factor for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1995 Apr;38(4):506-16.
67. Tsokos GC. Lymphocytes, cytokines, inflammation, and immune trafficking. *Curr Opin Rheumatol*. 1995 Sep;7(5):376-83.
68. Mohan C, Datta SK. Lupus: key pathogenic mechanisms and contributing factors. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995 Dec;77(3):209-20.
69. Prodeus AP, Goerg S, Shen LM, Pozdnyakova OO, Chu L, Alicot EM, et al. A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. *Immunity*. 1998 Nov;9(5):721-31.
70. Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V, et al. Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*. 2005 Mar 7;201(5):703-11.
71. Steinberg AD. Insights into the basis of systemic lupus. *J Autoimmun*. 1995 Dec;8(6):771-75.
72. Tsokos GC, Wong HK, Enyedy EJ, Nambiar MP. Immune cell signaling in lupus. *Curr Opin Rheumatol*. 2000 Sep;12(5):355-63.
73. Abbud Filho M, Pavarino-Bertelli EC, Alvarenga MP, Fernandes IM, Toledo RA, Tajara EH, et al. Systemic lupus erythematosus and microchimerism in autoimmunity. *Transplant Proc*. 2002 Nov;34(7):2951-2.

74. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar 4;100(5):2610-5.
75. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med*. 2003 Mar 17;197(6):711-23.
76. Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Papagiannis IG, Peterson MG, et al. Coordinate overexpression of interferon-alpha-induced genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004 Dec;50(12):3958-67.
77. Ronnblom L, Eloranta ML, Alm GV. The type I interferon system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2006 Feb;54(2):408-20.
78. Manzi S, Navratil JS, Ruffing MJ, Liu CC, Danchenko N, Nilson SE, et al. Measurement of erythrocyte C4d and complement receptor 1 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004 Nov;50(11):3596-604.
79. Papadimitraki ED, Choulaki C, Koutala E, Bertias G, Tsatsanis C, Gergianaki I, et al. 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*. 2006 Nov;54(11):3601-11.
80. Bijl M, Reefman E, Horst G, Limburg PC, Kallenberg CG. Reduced uptake of apoptotic cells by macrophages in systemic lupus erythematosus: correlates with decreased serum levels of complement. *Ann Rheum Dis*. 2006 Jan;65(1):57-63.
81. James JA, Harley JB, Scofield RH. Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2006 Sep;18(5):462-7.
82. Via CS, Handwerger BS. B-cell and T-cell function in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 1993 Sep;5(5):570-4.
83. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med*. 1994 Apr 1;179(4):1317-30.

84. Lehmann P, Holzle E, Kind P, Goerz G, Plewig G. Experimental reproduction of skin lesions in lupus erythematosus by UVA and UVB radiation. *J Am Acad Dermatol*. 1990 Feb;22(2 Pt 1):181-7.
85. Costenbader KH, Kim DJ, Peerzada J, Lockman S, Nobles-Knight D, Petri M, et al. Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Arthritis Rheum*. 2004 Mar;50(3):849-57.
86. Ghaussy NO, Sibbitt WL, Jr., Qualls CR. Cigarette smoking, alcohol consumption, and the risk of systemic lupus erythematosus: a case-control study. *J Rheumatol*. 2001 Nov;28(11):2449-53.
87. Parks CG, Cooper GS, Nylander-French LA, Sanderson WT, Dement JM, Cohen PL, et al. Occupational exposure to crystalline silica and risk of systemic lupus erythematosus: a population-based, case-control study in the southeastern United States. *Arthritis Rheum*. 2002 Jul;46(7):1840-50.
88. Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS. Risk factors for development of systemic lupus erythematosus: allergies, infections, and family history. *J Clin Epidemiol*. 2002 Oct;55(10):982-9.
89. Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Adv Immunol*. 2000;76:227-324.
90. Botto M, Walport MJ. Hereditary deficiency of C3 in animals and humans. *Int Rev Immunol*. 1993;10(1):37-50.
91. Turner MW, Hamvas RM. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Rev Immunogenet*. 2000;2(3):305-22.
92. Sastry K, Herman GA, Day L, Deignan E, Bruns G, Morton CC, et al. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. *J Exp Med*. 1989 Oct 1;170(4):1175-89.
93. Taylor ME, Brickell PM, Craig RK, Summerfield JA. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. *Biochem J*. 1989 Sep 15;262(3):763-71.

94. Lu JH, Thiel S, Wiedemann H, Timpl R, Reid KB. Binding of the pentamer/hexamer forms of mannan-binding protein to zymosan activates the proenzyme C1r2C1s2 complex, of the classical pathway of complement, without involvement of C1q. *J Immunol.* 1990 Mar 15;144(6):2287-94.
95. Matsushita M, Fujita T. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J Exp Med.* 1992 Dec 1;176(6):1497-502.
96. Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Thiel S, et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics.* 1994;40(1):37-44.
97. Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency--revisited. *Mol Immunol.* 2003 Sep;40(2-4):73-84.
98. Lipscombe RJ, Sumiya M, Hill AV, Lau YL, Levinsky RJ, Summerfield JA, et al. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet.* 1992 Dec;1(9):709-15.
99. Sumiya M, Super M, Tabona P, Levinsky RJ, Arai T, Turner MW, et al. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet.* 1991 Jun 29;337(8757):1569-70.
100. Lipscombe RJ, Beatty DW, Ganczakowski M, Goddard EA, Jenkins T, Lau YL, et al. Mutations in the human mannose-binding protein gene: frequencies in several population groups. *Eur J Hum Genet.* 1996;4(1):13-9.
101. Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol.* 1995 Sep 15;155(6):3013-20.
102. Madsen HO, Satz ML, Hogh B, Svejgaard A, Garred P. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J Immunol.* 1998 Sep 15;161(6):3169-75.
103. Navarra SV, Villamin CA, Baes RP, Pimenta L, Nicdao JL, Bernas GD. Increased frequency of mannose-binding lectin promoter LX haplotype among Filipinos with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2007;16(2):147-8.

104. Chies JA. On the haplotypic frequencies of the MBL2 gene among human populations. *Lupus*. 2007;16(10):838.
105. Neonato MG, Lu CY, Guilloud-Bataille M, Lapoumeroulie C, Nabeel-Jassim H, Dabit D, et al. Genetic polymorphism of the mannose-binding protein gene in children with sickle cell disease: identification of three new variant alleles and relationship to infections. *Eur J Hum Genet*. 1999 Sep;7(6):679-86.
106. Mombo LE, Lu CY, Ossari S, Bedjabaga I, Sica L, Krishnamoorthy R, et al. Mannose-binding lectin alleles in sub-Saharan Africans and relation with susceptibility to infections. *Genes Immun*. 2003 Jul;4(5):362-7.
107. Davies EJ, Snowden N, Hillarby MC, Carthy D, Grennan DM, Thomson W, et al. Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1995 Jan;38(1):110-4.
108. Davies EJ, Tikly M, Wordsworth BP, Ollier WE. Mannose-binding protein gene polymorphism in South African systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol*. 1998 Apr;37(4):465-6.
109. Lau YL, Lau CS, Chan SY, Karlberg J, Turner MW. Mannose-binding protein in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1996 Apr;39(4):706-8.
110. Sullivan KE, Wooten C, Goldman D, Petri M. Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1996 Dec;39(12):2046-51.
111. Sullivan KE, Jawad AF, Piliro LM, Kim N, Luan X, Goldman D, et al. Analysis of polymorphisms affecting immune complex handling in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2003 Mar;42(3):446-52.
112. Villarreal J, Crosdale D, Ollier W, Hajeer A, Thomson W, Ordi J, et al. Mannose binding lectin and FcγRIIa (CD32) polymorphism in Spanish systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2001 Sep;40(9):1009-12.
113. Carthy D, Hajeer A, Ollier B, Tarassi K, Papasteriades C, Boki K, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphism in Greek systemic lupus erythematosus patients. *Br J Rheumatol*. 1997 Nov;36(11):1238-9.



114. Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Muraki Y, Goto D, Matsumoto I, et al. Association of mannose binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2005 Feb;64(2):311-4.
115. Garred P, Voss A, Madsen HO, Junker P. Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Genes Immun*. 2001 Dec;2(8):442-50.
116. Lee YH, Witte T, Momot T, Schmidt RE, Kaufman KM, Harley JB, et al. The mannose-binding lectin gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus: two case-control studies and a meta-analysis. *Arthritis Rheum*. 2005 Dec;52(12):3966-74.
117. Mok MY, Ip WK, Lau CS, Lo Y, Wong WH, Lau YL. Mannose-binding lectin and susceptibility to infection in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2007 Jun;34(6):1270-6.
118. Bultink IE, Hamann D, Seelen MA, Hart MH, Dijkmans BA, Daha MR, et al. Deficiency of functional mannose-binding lectin is not associated with infections in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(6):R183.
119. Font J, Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Nardi N, Ibanez A, Suarez B, et al. Association of mannose-binding lectin gene polymorphisms with antiphospholipid syndrome, cardiovascular disease and chronic damage in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2006 Jun 26.
120. Ohlenschlaeger T, Garred P, Madsen HO, Jacobsen S. Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2004 Jul 15;351(3):260-7.
121. Calvo-Alen J, Alarcon GS, Tew MB, Tan FK, McGwin G, Jr., Fessler BJ, et al. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort: XXXIV. Deficient mannose-binding lectin exon 1 polymorphisms are associated with cerebrovascular but not with other arterial thrombotic events. *Arthritis Rheum*. 2006 Jun;54(6):1940-5.
122. Garcia-Laorden MI, Rua-Figueroa I, Perez-Aciego P, Rodriguez-Perez JC, Citores MJ, Alamo F, et al. Mannose binding lectin polymorphisms as a disease-modulating factor in women with systemic lupus erythematosus from Canary Islands, Spain. *J Rheumatol*. 2003 Apr;30(4):740-6.

123. Bertoli AM, Fernandez M, McGwin G, Jr., Alarcon GS, Tan FK, Reveille JD, et al. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort: XXXVI. Influence of mannose-binding lectin exon 1 polymorphisms in disease manifestations, course, and outcome. *Arthritis Rheum.* 2006 May;54(5):1703-4.
124. Piao W, Liu CC, Kao AH, Manzi S, Vogt MT, Ruffing MJ, et al. Mannose-binding lectin is a disease-modifying factor in North American patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2007 Jul;34(7):1506-13.
125. Jakab L, Laki J, Sallai K, Temesszentandrasei G, Pozsonyi T, Kalabay L, et al. Association between early onset and organ manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE) and a down-regulating promoter polymorphism in the MBL2 gene. *Clin Immunol.* 2007 Dec;125(3):230-6.
126. Seelen MA, Trouw LA, van der Hoorn JW, Fallaux-van den Houten FC, Huizinga TW, Daha MR, et al. Autoantibodies against mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2003 Nov;134(2):335-43.
127. Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Goto D, Matsumoto I, Ito S, et al. Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2004 Jun;136(3):585-90.
128. Mok MY, Jack DL, Lau CS, Fong DY, Turner MW, Isenberg DA, et al. Antibodies to mannose binding lectin in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2004;13(7):522-8.
129. Shoenfeld Y, Szyper-Kravitz M, Witte T, Doria A, Tsutsumi A, Tatsuya A, et al. Autoantibodies against protective molecules--C1q, C-reactive protein, serum amyloid P, mannose-binding lectin, and apolipoprotein A1: prevalence in systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Jun;1108:227-39.

## **5 ARTIGOS CIENTÍFICOS**

## **Paper**

### **The role of Mannose-Binding Lectin polymorphisms in Brazilian patients with Systemic Lupus Erythematosus**

<sup>1</sup>Odirlei André Monticielo, <sup>1</sup>Ricardo Machado Xavier, <sup>2</sup>José Artur Bogo Chies, <sup>1</sup>Tamara Mucenic, <sup>1</sup>Guilherme Gischkow Rucatti, <sup>1</sup>José Mauro Zimmermann Júnior, <sup>1</sup>João Carlos Tavares Brenol.

<sup>1</sup>Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Correspondence address:

Odirlei André Monticielo

Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Largo Eduardo Zaccaro Faraco, Sala 645, 6º andar, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - 90035-903

Telephone/Fax: 55 51 33313834

E-mail: [omonticielo@yahoo.com.br](mailto:omonticielo@yahoo.com.br)

## **Abstract**

**Objective:** To examine potential associations of the mannose-binding lectin (MBL) alleles G57E, G54D, IVSnt5, R52C and R52H with susceptibility to and clinical expression of systemic lupus erythematosus (SLE) in southern Brazilian patients.

**Methods:** Three hundred and twenty seven consecutive patients with diagnosis of SLE, satisfying the American College of Rheumatology criteria, who were recruited from the outpatient clinic of the Division of Rheumatology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and 165 healthy controls from the same geographic area, were genotyped by Restriction Fragment Length Polymorphism-Polimerase Chain Reaction (RFLP-PCR) analysis. Clinical, demographic and laboratory data were collected.

**Results:** A statistically significant difference in the frequencies of allele R52C was observed in European-derived SLE patients as compared to controls (9.6% vs. 3.3%,  $P=0.001$ , odds ratio 3.01, 95% confidence interval 1.582-6.060,  $P<0.05$ ). The frequencies of alleles G54D and G57E were not different between European-derived SLE patients and controls (allele G54D 15.9% vs. 18.8%,  $P=0.317$  and allele G57E 3.6% vs. 3.0%,  $P=0.796$ ). There were no differences between clinical and laboratory features in SLE patients according to the presence or absence of MBL allelic variants.

**Conclusion:** These results support an increased risk of SLE in European-derived individuals with allele R52C. Patients carrying this allele have an approximately 3-fold higher odds ratio of developing SLE when compared with controls. Our data do not support associations between any MBL allelic variants and clinical expression of SLE in southern Brazilian population.

**Key-words:** Systemic Lupus Erythematosus, Mannose-Binding Lectin, Risk Factors, Complement, Genetics and Immunology.

## Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune inflammatory disease that involves many organs and systems. It is characterized by autoantibody production mainly directed against nuclear antigens and immune complex formation and deposition, which lead to intense inflammatory response and tissue damage. It presents multiple clinical and laboratory features that, in some cases, makes its diagnosis a great challenge.

The etiopathogenesis of SLE remains unclear, probably involving genetic, hormonal, immunological and environmental susceptibility factors. A meta-analysis of genome-wide linkage studies of SLE identified three regions showing the most consistent evidence for susceptibility: 6p21.1-q15, 20p11-q13.13 and 16p13-q12.2 [1]. It is thought that interactions of all these factors contribute to the development of SLE. The complement system involves both the innate and the adaptive immune systems and has important roles in the pathogenesis of SLE. Hereditary complement deficiencies, especially of early components of the classical pathway ( $C_1q$ ,  $C_1r$ ,  $C_1s$ ,  $C_2$  and  $C_4$ ), are strongly associated with SLE. The association between complement deficiencies and SLE could be explained by several mechanisms, including impaired clearance of immune complexes and apoptotic cells, aberrant tolerance induction or changes in cytokine regulation [2].

The mannose-binding lectin gene (*MBL-2*), a single 4-exon gene located on chromosome 10, has emerged as a candidate for SLE susceptibility due to the MBL role in innate immunity and to possible association between its deficiency and autoimmune diseases [3]. MBL is an acute-phase protein synthesized by the liver and able to bind to apoptotic cell debris. It is involved in the phagocytosis of apoptotic cells by

macrophages. Some polymorphic variants, mainly in the coding region of the *MBL-2* gene, are associated with MBL deficiency. Three functional single-nucleotide polymorphisms (SNP) have been described, giving rise to three structural variant alleles: at codons 54 (allele G54D or B), 57 (allele G57E or C), and 52 (allele R52C or D) [4-6]. Altogether, the presence of any B, C or D allele has been collectively labeled as O, whereas the simultaneous absence of variants at the three codons has been called as allele A. Besides these exon 1 variants, SNPs at promoter regions -550 (alleles H/L), -221 (alleles X/Y) and +4 (alleles P/Q) were identified [7]. Subsequently, four common haplotypes were described for these promoter variants: LXP, LYP, LYQ and HYP, where HYP is associated with medium to high levels of MBL and LXP is associated with low levels of this protein [8]. These promoter haplotypes are in strong linkage disequilibrium with SNPs at exon 1, resulting in seven common extended haplotypes: HYPA, LYPA, LYQA, LXPA, HYPD, LYPB and LYQC [7]. Several studies have observed a high occurrence of these polymorphic variants in SLE patients [9]. Furthermore, different studies observed the association of some allelic variants with specific clinical features in SLE patients, although the variety of clinical features and human populations studied made data interpretation rather difficult [3]. Other two uncommon polymorphisms have already been described: at codon 52 (allele R52H) and in the first intron at position 5 (allele IVSnt5). Both of them do not have well-established relations with MBL phenotype and they have never been studied in SLE patients [10, 11].

Facing the inconsistent reports concerning the role of MBL in SLE and lack of studies in Brazil, this study aims to investigate associations between MBL alleles G57E, G54D, R52C, IVSnt5 and R52H and susceptibility and clinical expression of SLE in patients from southern Brazil.

## **Patients and Methods**

### **Study Population**

The study population was comprised of 327 SLE patients, 249 (76.1%) of which were identified as European-derived and 78 (23.9%) were identified as African-derived. This classification was based on physical appearance, as judged by the researcher at the time of blood collection, and data about the ethnicity of parents/grandparents reported by the participants. The issue arisen on the skin color-based classification criteria that is used in Brazil is well documented [12] and has been already assessed by our group in previous studies [13]. The patients have received follow-up care at the Division of Rheumatology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The medical records were reviewed for documentation of demographic, clinical and laboratory data (Table 1). All patients fulfilled the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of SLE [14].

The clinical manifestations evaluated were: photosensitivity, malar rash, discoid rash, oral or nasal ulcers, arthritis, serositis (pleuritis or pericarditis), nephritis and neurological disease, defined as seizures or psychosis. The laboratory evaluation included hematological disorders (hemolytic anemia, leukopenia, lymphopenia or thrombocytopenia), positive ANA and several autoantibodies as anti-dsDNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro/SS-A, anti La/SS-B, anticardiolipin, lupus anticoagulant and false positive VDRL. The patients were also evaluated in regard to secondary antiphospholipid syndrome and Sjögren's syndrome, according to the classification criteria for both diseases [15, 16]. SLEDAI disease activity index [17] and SLICC damage index [18] were applied to each patient as a measurement of disease activity and cumulative damage, respectively.



The control group was composed of 165 European-derived healthy people from the same urban center and with similar ethnic origin. We did not include African-derived controls; therefore, we used only the group of SLE African-derived patients to compute data related to epidemiology and relationship of clinical and laboratory data with the presence of allelic variants. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and informed consent according to the Declaration of Helsinki was obtained from all patients.

### **DNA Extraction and Genotyping**

DNA was isolated from peripheral blood cells using a salting out method [19]. DNA samples were stored at -20°C. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of exon 1 of the *MBL-2* gene was performed with sequence-specific primers: A (5'ACCCAGATTGTAGGACAGAG3') and B (5'CCTTCCAGAGGAAACTGCCTGGGGATAT3') for the determination of G57E, G54D, IVSnt5 and R52H polymorphisms and B and R52C (5'CATCAACGGCTTCCCAGGCAAAGACGCG3') for R52C polymorphism. The amplifications were carried out in reactions containing PCR buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, specific primers and Taq DNA polymerase (Invitrogen Corporation, San Diego, CA, USA) and were submitted to 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 54°C for 30 seconds (56°C for the R52C polymorphism) and 72°C for 30 seconds; preceded by a 5-minute denaturation stage at 94°C and finalized with a 5-minute extension phase at 72°C. Amplified PCR products were cleaved by specific restriction enzymes in ideal conditions according to the manufacturer's guidance: *MbolI* to G57E, *BanI* to G54D, *NlaIII* to IVSnt5 and R52H, and *HhaI* and *MluI* to R52C. Digested fragments were visualized in

6% polyacrylamide gel stained with ethidium bromide under ultraviolet light. This sequence procedure was in accordance with previous reports [5, 10].

### **Statistical analysis**

A descriptive analysis of data through calculation of mean and standard deviation for quantitative variables was performed while the frequency and percentage were calculated for categorical variables. We used the chi-square test or Fisher's exact test in the comparison between the presence and absence of polymorphic variants. Besides these tests, we calculated the odds ratio and the confidence interval. For the comparison of clinical and laboratory variables with the presence or absence of polymorphic variants, we used the chi-square test to compare qualitative variables and the Student's t-test (or Mann-Whitney) for quantitative variables, using the Bonferroni correction to the level of statistical significance. The Hardy-Weinberg equilibrium test was held in cases and controls using the chi-square test. Data were analyzed with SPSS software version 13.0 and two-tailed value of  $P < 0.05$  was taken to indicate statistical significance.

### **Results**

Three hundred and twenty seven SLE patients were included, 300 (91.7%) of which were women and 27 (8.3%) were men. The patients' mean age was  $42.2 \pm 14.3$  years and the mean disease diagnostic age was  $32.7 \pm 13.6$  years. Table 1 shows the frequencies of clinical and laboratory features. Secondary antiphospholipid syndrome was found in 6.4% (20/311) and Sjögren's syndrome in 10.9% (34/312). The median for

SLEDAI and SLICC was 1 (25-75<sup>th</sup> percentile). Few differences on disease features were found between the ethnic groups. The European-derived group presented a higher proportion of individuals with photosensitivity (78.6% vs. 58.4%) and lower proportion of leukopenia or lymphopenia (58.1% vs. 71.4%). The presence of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B was significantly higher in the African-derived group (64.3% and 22.9% vs. 37.4% and 11.2%, respectively). When sub-grouping the SLE patients by gender, we observed that male patients presented a higher frequency of nephritis (70.4% against 40.6%,  $P=0.005$ ), although the number of individuals in this group was relatively small. No other significant differences were found between genders.

*MBL-2* gene polymorphism distribution was studied in patients with SLE and healthy controls (Table 2). Variant alleles R52H and IVSnt5 were not found in the studied population. The genotypic distribution of all other three polymorphisms found in cases and controls were in Hardy-Weinberg equilibrium. The summary nomenclature used for MBL genotypes was as follows: A/A indicates homozygosis for wild type allelic variants, A/O indicates heterozygosis with the presence of one allelic variant mutant (allele B, allele C or allele D) and O/O indicates homozygosis for any variant (B, C or D) allele. Among 249 European-derived patients with SLE, 129 (51.8%) were A/A, 95 (38.2%) were A/O and 25 (10%) were O/O. When compared to European-derived healthy controls [94 (57%), 59 (35.8%) and 12 (7.2%), respectively], no statistically significant difference was observed ( $P=0.442$ ).

When MBL allelic frequencies in SLE patients and healthy controls were analyzed, a statistically significant higher prevalence of allele D was found in the patient group [48 (9.6%) vs. 11 (3.3%),  $P=0.001$ ]. For the other two allelic variants (alleles B and C) no statistically significant difference was observed (Table 3). The overall odds

ratio (OR) of allele D was 3.01 [95% confidence interval (CI) 1.582-6.060,  $P < 0.05$ ]. Only European-derived patients and controls were compared.

The differences in disease features in patients with SLE categorized by MBL genotypes are summarized in Table 4. We included clinical characteristics of the classification criteria, autoantibodies, secondary antiphospholipid syndrome, Sjögren's syndrome and measurements of disease activity and cumulative damage through SLEDAI and SLICC, respectively. A higher frequency of leukopenia and lymphopenia was observed in O/O genotype (76% vs. 24%,  $P = 0.037$ ) and a lower frequency of lupus anticoagulant was observed in O/O genotype (84% vs. 16%,  $P = 0.04$ ) European-derived SLE patients. However, after applying the Bonferroni correction, these differences did not reach statistical significance. Prevalence of clinical features was compared with individual allelic frequencies. Some interesting findings were obtained, such as: higher prevalence of hematological disorders (88.9% vs. 72.4%,  $P = 0.033$ ), thrombocytopenia (33.3% vs. 15.3%,  $P = 0.009$ ), lupus anticoagulant (13.3% vs. 4.5%,  $P = 0.038$ ), psychosis (13.3% vs. 4.9%,  $P = 0.049$ ), and lower frequency of anti-Ro/SS-A (21.4% vs. 41.5%,  $P = 0.027$ ) with the presence of allele D in European-derived SLE patients. In African-derived patients, leukopenia or lymphopenia had higher frequency with allele B (94.1% vs. 65.0%,  $p = 0.009$ ) and nephritis and anti-Ro/SS-A had lower frequency in the presence of allele B and C, respectively (17.6% vs. 55.0%,  $P = 0.014$  and 30.8% vs. 71.9%,  $P = 0.009$ , respectively). Nevertheless, after applying the Bonferroni correction, no statistical significance was maintained.

## **Discussion**

This study analyzed the cumulative prevalence of clinical and laboratory features, the frequency of secondary antiphospholipid and Sjögren's syndrome and described the measurements of disease activity and cumulative damage in SLE patients. Compared with the current literature data, we observed that our population presented higher proportion of hemolytic anemia and photosensitivity [20]. When sub-grouping by ethnic origin, few differences were observed between the SLE patients. The European-derived patients presented higher proportion of photosensitivity, but a lower frequency of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B autoantibodies, which are frequently related to cutaneous manifestations. This result could be explained by the inherent difficulty in detecting this manifestation in patients with a dark skin. The African-derived patients presented higher proportion of leukopenia and lymphopenia than the European-derived group. When the SLE patients were sub-grouped by gender, we observed that males had a higher prevalence of nephritis than females; however this result should be considered with caution due to the relatively low number of male patients. The prevalence of secondary antiphospholipid syndrome and Sjögren's syndrome was 6.4% and 10.9%, respectively, considering all patients. Both frequencies were in accordance with previous reports [21, 22]. Medians for SLICC and SLEDAI were relatively low, which indicate that our SLE patients had low activity and damage indexes, although the patients were diagnosed at around ten years ago. Thus, low disease indexes could be due to a greater number of patients with mild to moderate disease in our population or could be secondary to efficient treatment.

Several studies have shown that *MBL-2* gene polymorphisms influence susceptibility to SLE and could be associated with some clinical and laboratory features, disease progression, cardiovascular disease and increased risk of infection [3].

Nevertheless, the true role of MBL deficiency for the onset and progression of SLE remains unclear, since data from different studies are controversial because of inconsistent genetic associations. There are two possible explanations for this: a) the different ethnic backgrounds of studied populations and b) limited number of patients with poor matching for cases and controls. The influence of *MBL-2* polymorphisms on populations with specific ethnic backgrounds can determine different relative risks according to their interaction with distinct factors, which could involve other genetic markers, environmental exposure, immunological alterations and/or hormonal variations. Due to the high variability of *MBL-2* variant frequencies in different populations, attempts to increase the statistical power by grouping data from different studies and populations are quite difficult.

A meta-analysis involving studies with three ethnic populations: European-derived, African-derived and Asian-derived, concluded that allele B and polymorphisms at the promoter region, specifically those found at positions -550 and -221, were risk factors for SLE development, with a relative risk of 1.40, 1.48 and 1.22, respectively [9]. In our study, no statistical significant associations were found between alleles B and C and SLE patients. However, we observed a significant difference concerning the presence of allele D in European-derived SLE patients as compared to healthy controls, determining an OR of 3.1, contrasting with data from Piao *et al.* [34] and Villareal *et al.* [23].

The frequency of mutant alleles varies greatly, depending on the population studied. Allele B has a prevalence of ~26% in European-derived populations and the allele C is found at a frequency of 50–60% in African-derived populations [24]. For allele D, the prevalence in different studied populations is very low [25]. In Brazil, there are

significant differences in the distribution of *MBL-2* gene variants [26]. A study with European-derived healthy individuals in southern Brazil found the frequencies of 15.2%, 1.5% and 5.4% for alleles B, C and D, respectively [27]. Another study focused on ethnically mixed healthy individuals in northern Brazil observed the frequencies of 13.6% and 16.2% for allele B and D, respectively [28]. According to Garred *et al.*, allele D did not reduce protein concentration as much as alleles B and C [29]. This is an interesting observation, since our study does not indicate any influence of alleles B and C, although allele D was detected as an important risk factor.

Another interesting fact is the large number of studies attempting to establish associations between clinical and laboratory features and specific MBL alleles. Takahashi *et al.* observed a higher frequency of infections and a decrease in C<sub>3</sub> and CH<sub>50</sub> in SLE patients homozygous to allele B [30]. Font *et al.* showed that SLE patients with MBL deficiency had a relative risk of cardiovascular diseases of 3.1, although the presence of antiphospholipid antibodies in these patients was a confounding factor [31]. Ohlenschlaeger *et al.* observed a significant correlation between some MBL allelic variants and increased risk of arterial thrombosis [32]. Calvo-Alen *et al.* observed an association between *MBL-2* allelic variants and cerebrovascular disease in SLE European-derived patients. It should be noted that these authors suggested the influence of *MBL-2* alleles on thromboembolic diseases was dependent on the ethnic background of the studied population [33]. A study with SLE women in Canary Islands evidenced an association of MBL deficiency with low frequency of autoantibodies and delayed development of the disease [34]. Bertoli *et al.* showed that carriers of variant alleles for *MBL-2* gene in North-American patients with SLE had low levels of serositis, renal involvement and antiphospholipid antibodies, but higher prevalence of leukopenia

as compared to controls [35]. Piao *et al.* observed a significantly higher prevalence of anti-Sm antibody associated with genotypes A/B and A/C in a North-American group of SLE patients and they suggested the MBL variants as disease-modifying factors, particularly considering renal involvement [36]. Mok *et al.* showed that low serum MBL level predisposes Chinese SLE patients to infections, and in particular bacterial infections [37]. It should be noted that not all studies indicate a strict correlation between functional MBL and the development of infections in SLE patients, as exemplified by a lack of association between functional MBL serum levels or MBL activity and major infections in SLE patients [38]. Jakab *et al.*, studying Chinese patients, found that the frequency of juvenile-onset SLE ( $\leq 20$  years) was particularly high among XA/XA homozygotes (17.4%) as compared to the rest of the patients (5.6%) and that XA/XA carriers had significantly higher risk of developing cutaneous manifestations ( $p=0.003$ ) and pleuritis/pericarditis ( $p=0.013$ ), when compared with the remaining patients [39]. No statistically significant associations were found between clinical and laboratory characteristics and the frequency of the variant alleles in our population.

In this study, patients and controls were also genotyped for two minor *MBL-2* polymorphisms. The first one was a polymorphism involving a G to A nucleotide substitution in the position five of the first intron (IVSnt5). This variant was first described in African-derived patients with sickle cell anemia. This polymorphism presents a relation to the LY haplotype and is associated with lower MBL plasma levels than those found in the HY haplotype [11]. The second one was a G to A nucleotide substitution in the codon 52, different from classical allele D. This polymorphism was first described in an African-derived population and its relationship with the MBL phenotype has not been



well-established yet [10]. Both polymorphisms have never been studied in lupus patients and were not observed in our sample, probably due to their low frequency.

In conclusion, our data indicated that the allele D frequency was increased in SLE patients as compared to controls from the same ethnic background, configuring an important risk factor for SLE development in the southern Brazilian population. However, *MBL-2* allelic variants do not seem to have a direct effect on clinical and/or laboratorial features of SLE in our population. This reinforces the proposal that *MBL-2* alleles are risk factors for SLE development and that these risk factors vary according to the studied population. Therefore, more studies will be needed to clarify the true role of MBL in SLE.

### **Acknowledgements**

This study was partially supported by grants from Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **References**

1. Forabosco, P., J.D. Gorman, C. Cleveland, et al., *Meta-analysis of genome-wide linkage studies of systemic lupus erythematosus*. *Genes Immun*, 2006. 7(7): p. 609-14.
2. Truedsson, L., A.A. Bengtsson, and G. Sturfelt, *Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus*. *Autoimmunity*, 2007. 40(8): p. 560-6.
3. Monticielo, O.A., T. Mucenic, R.M. Xavier, J.C. Brenol, and J.A. Chies, *The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus*. *Clin Rheumatol*, 2008. 27(4): p. 413-9.

4. Lipscombe, R.J., M. Sumiya, A.V. Hill, et al., *High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene*. Hum Mol Genet, 1992. 1(9): p. 709-15.
5. Madsen, H.O., P. Garred, J.A. Kurtzhals, et al., *A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein*. Immunogenetics, 1994. 40(1): p. 37-44.
6. Sumiya, M., M. Super, P. Tabona, et al., *Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children*. Lancet, 1991. 337(8757): p. 1569-70.
7. Madsen, H.O., P. Garred, S. Thiel, et al., *Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein*. J Immunol, 1995. 155(6): p. 3013-20.
8. Madsen, H.O., M.L. Satz, B. Høgh, A. Svejgaard, and P. Garred, *Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America*. J Immunol, 1998. 161(6): p. 3169-75.
9. Lee, Y.H., T. Witte, T. Momot, et al., *The mannose-binding lectin gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus: two case-control studies and a meta-analysis*. Arthritis Rheum, 2005. 52(12): p. 3966-74.
10. Mombo, L.E., C.Y. Lu, S. Ossari, et al., *Mannose-binding lectin alleles in sub-Saharan Africans and relation with susceptibility to infections*. Genes Immun, 2003. 4(5): p. 362-7.
11. Neonato, M.G., C.Y. Lu, M. Guilloud-Bataille, et al., *Genetic polymorphism of the mannose-binding protein gene in children with sickle cell disease: identification of three new variant alleles and relationship to infections*. Eur J Hum Genet, 1999. 7(6): p. 679-86.
12. Parra, F.C., R.C. Amado, J.R. Lambertucci, et al., *Color and genomic ancestry in Brazilians*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(1): p. 177-82.
13. Vargas, A.E., A.R. Marrero, F.M. Salzano, M.C. Bortolini, and J.A. Chies, *Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations*. Braz J Med Biol Res, 2006. 39(3): p. 321-5.

14. Hochberg, M.C., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1997. 40(9): p. 1725.
15. Vitali, C., S. Bombardieri, R. Jonsson, et al., *Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group*. *Ann Rheum Dis*, 2002. 61(6): p. 554-8.
16. Miyakis, S., M.D. Lockshin, T. Atsumi, et al., *International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS)*. *J Thromb Haemost*, 2006. 4(2): p. 295-306.
17. Bombardier, C., D.D. Gladman, M.B. Urowitz, D. Caron, and C.H. Chang, *Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE*. *Arthritis Rheum*, 1992. 35(6): p. 630-40.
18. Gladman, D., E. Ginzler, C. Goldsmith, et al., *The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1996. 39(3): p. 363-9.
19. Lahiri, D.K. and J.I. Nurnberger, Jr., *A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies*. *Nucleic Acids Res*, 1991. 19(19): p. 5444.
20. Font, J., R. Cervera, M. Ramos-Casals, et al., *Clusters of clinical and immunologic features in systemic lupus erythematosus: analysis of 600 patients from a single center*. *Semin Arthritis Rheum*, 2004. 33(4): p. 217-30.
21. Manoussakis, M.N., C. Georgopoulou, E. Zintzaras, et al., *Sjogren's syndrome associated with systemic lupus erythematosus: clinical and laboratory profiles and comparison with primary Sjogren's syndrome*. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(3): p. 882-91.
22. Tarr, T., G. Lakos, H.P. Bhattoa, et al., *Clinical thrombotic manifestations in SLE patients with and without antiphospholipid antibodies: a 5-year follow-up*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2007. 32(2): p. 131-7.

23. Villarreal, J., D. Crosdale, W. Ollier, et al., *Mannose binding lectin and FcγRIIIa (CD32) polymorphism in Spanish systemic lupus erythematosus patients*. *Rheumatology (Oxford)*, 2001. 40(9): p. 1009-12.
24. Lipscombe, R.J., D.W. Beatty, M. Ganczakowski, et al., *Mutations in the human mannose-binding protein gene: frequencies in several population groups*. *Eur J Hum Genet*, 1996. 4(1): p. 13-9.
25. Turner, M.W., *The role of mannose-binding lectin in health and disease*. *Mol Immunol*, 2003. 40(7): p. 423-9.
26. Boldt, A.B., L. Culpi, L.T. Tsuneto, et al., *Diversity of the MBL2 gene in various Brazilian populations and the case of selection at the mannose-binding lectin locus*. *Hum Immunol*, 2006. 67(9): p. 722-34.
27. Alves Pedroso, M.L., A.B. Boldt, L. Pereira-Ferrari, et al., *Mannan-binding lectin MBL2 gene polymorphism in chronic hepatitis C: association with the severity of liver fibrosis and response to interferon therapy*. *Clin Exp Immunol*, 2008. 152(2): p. 258-64.
28. Vallinoto, A.C., M.R. Menezes-Costa, A.E. Alves, et al., *Mannose-binding lectin gene polymorphism and its impact on human immunodeficiency virus 1 infection*. *Mol Immunol*, 2006. 43(9): p. 1358-62.
29. Garred, P., F. Larsen, H.O. Madsen, and C. Koch, *Mannose-binding lectin deficiency--revisited*. *Mol Immunol*, 2003. 40(2-4): p. 73-84.
30. Takahashi, R., A. Tsutsumi, K. Ohtani, et al., *Association of mannose binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheum Dis*, 2005. 64(2): p. 311-4.
31. Font, J., M. Ramos-Casals, P. Brito-Zeron, et al., *Association of mannose-binding lectin gene polymorphisms with antiphospholipid syndrome, cardiovascular disease and chronic damage in patients with systemic lupus erythematosus*. *Rheumatology (Oxford)*, 2006.
32. Ohlenschlaeger, T., P. Garred, H.O. Madsen, and S. Jacobsen, *Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus*. *N Engl J Med*, 2004. 351(3): p. 260-7.

33. Calvo-Alen, J., G.S. Alarcon, M.B. Tew, et al., *Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort: XXXIV. Deficient mannose-binding lectin exon 1 polymorphisms are associated with cerebrovascular but not with other arterial thrombotic events*. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(6): p. 1940-5.
34. Garcia-Laorden, M.I., I. Rua-Figueroa, P. Perez-Aciego, et al., *Mannose binding lectin polymorphisms as a disease-modulating factor in women with systemic lupus erythematosus from Canary Islands, Spain*. *J Rheumatol*, 2003. 30(4): p. 740-6.
35. Bertoli, A.M., M. Fernandez, G. McGwin, Jr., et al., *Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort: XXXVI. Influence of mannose-binding lectin exon 1 polymorphisms in disease manifestations, course, and outcome*. *Arthritis Rheum*, 2006. 54(5): p. 1703-4.
36. Piao, W., C.C. Liu, A.H. Kao, et al., *Mannose-binding lectin is a disease-modifying factor in North American patients with systemic lupus erythematosus*. *J Rheumatol*, 2007. 34(7): p. 1506-13.
37. Mok, M.Y., W.K. Ip, C.S. Lau, et al., *Mannose-binding lectin and susceptibility to infection in Chinese patients with systemic lupus erythematosus*. *J Rheumatol*, 2007. 34(6): p. 1270-6.
38. Bultink, I.E., D. Hamann, M.A. Seelen, et al., *Deficiency of functional mannose-binding lectin is not associated with infections in patients with systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Res Ther*, 2006. 8(6): p. R183.
39. Jakab, L., J. Laki, K. Sallai, et al., *Association between early onset and organ manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE) and a down-regulating promoter polymorphism in the MBL2 gene*. *Clin Immunol*, 2007. 125(3): p. 230-6.

**Table 1** Demographic, clinical, and laboratory features of SLE patients

Patients' features	Whole (n=327)	European-derived (n=249)	African-derived (n=78)	P value*
Females	91.7% (327)	91.2% (249)	93.6% (78)	0.658
Age (years)	42.2±14.3 (327)	42.8±14.7 (249)	40.3±12.9 (78)	0.578
Diagnosis age (years)	32.7±13.6 (323)	32.6 ±13.6 (246)	33.2±12.8 (77)	0.503
Malar rash	53.5% (325)	54.8% (248)	49.4% (77)	0.476
Discoid rash	14.5% (325)	14.9% (248)	13.0% (77)	0.814
Photosensitivity	73.8% (325)	78.6% (248)	58.4 % (77)	<b>0.001</b>
Oral ulcers	36.3% (325)	37.5% (248)	32.5% (77)	0.505
Arthritis	83.1% (325)	82.7% (248)	84.4% (77)	0.853
Serositis	31.8% (324)	29.6% (247)	39.0% (77)	0.159
Nephritis	43.1% (325)	41.9% (248)	46.8% (77)	0.539
Neurological disorders	11.7% (325)	12.1% (248)	10.4% (77)	0.838
Hematological disorders	77.8 % (325)	75.4 % (248)	85.7% (77)	0.081
Hemolytic anemia	30.8% (325)	31.5% (248)	28.6% (77)	0.736
Leukopenia/Lymphopenia	61.2% (325)	58.1% (248)	71.4% (77)	<b>0.049</b>
Thrombocytopenia	19.1% (325)	18.5% (248)	20.8% (77)	0.788
Immunologic disorders	65.5% (322)	64.9% (245)	67.5% (77)	0.774
Anti-DNA	47.2% (322)	46.1% (245)	50.6% (77)	0.573
Anti-Sm	19.6% (322)	18.8% (245)	22.1% (77)	0.637
Anticardiolipin	26.2% (321)	25.4% (245)	28.6% (77)	0.688
Lupus Anticoagulant	5.3% (321)	6.1% (244)	2,6% (77)	0.380
False positive VDRL	2.5% (321)	2.9% (244)	1.3% (77)	0.685
ANA	98.8% (323)	98.8% (246)	98.7% (77)	1.000
Anti-Ro/SS-A	44.2% (276)	37.4% (206)	64.3% (70)	<b>&lt;0.001</b>
Anti-La/SS-B	14.1% (276)	11.2% (206)	22.9% (70)	<b>0.026</b>
Anti-RNP	30.8% (276)	31.1% (206)	30.0% (70)	0.986
Sjögren	10.9% (312)	10.9% (238)	10.8% (74)	1.000
APS	6.4% (311)	7.2% (237)	4.1% (74)	0.426
SLEDAI	1 (0-4) (263)	1 (0-4) (194)	1 (0-4) (69)	0.974
SLICC	1 (0-2) (304)	1 (0-2) (230)	1 (0-2) (74)	0.910

Abbreviations: ANA: antinuclear antibody; APS: antiphospholipid syndrome; SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; SLICC: systemic lupus international collaborating clinics; VDRL: venereal disease research laboratory test

\* Chi-square test for qualitative variables and Mann-Whitney test for quantitative variables

**Table 2** MBL genotypic frequency in SLE patients and healthy controls

Genotype	European-derived	
	Patients (%) n=249	Controls (%) n=165
AA	129 (51.8)	94 (57.0)
AO	95 (38.2)	59 (35.8)
OO	25 (10.0)	12 (7.2)
P value*	0.442	

Abbreviations: A (wild type allele) and O (allele B or C or D)

\* Chi-square test

**Table 3** MBL allelic frequency in SLE patients and healthy controls

Alleles	European-derived		
	Patients (%) 2n=498	Controls (%) 2n=330	P value*
Allele A	353 (70.9)	247 (74.9)	0.218
Allele B	79 (15.9)	62 (18.8)	0.317
Allele C	18 (3.6)	10 (3.0)	0.796
Allele D	48 (9.6)	11 (3.3)	<b>0.001</b>

\* Chi-square test

**Table 4** Clinical and laboratory characteristics in SLE patients categorized by different MBL genotype

Patients' features <sup>a</sup>	European-derived (n=249)			African-derived (n=78)		
	A/A (%) n=129	A/O (%) n=95	O/O (%) n=25	A/A (%) n=45	A/O (%) n=29	O/O (%) n=4
Malar rash	56.3	53.7	52.0	52.3	41.4	75.0
Discoid rash	12.5	20.0	8.0	13.6	13.8	0.0
Photosensitivity	82.8	74.7	72.0	65.9	48.3	50.0
Oral ulcers	36.7	42.1	24.0	29.5	37.9	25.0
Arthritis	79.7	88.4	76.0	81.8	89.7	75.0
Serositis	25.8	35.1	28.0	36.4	41.4	50.0
Nephritis	43.8	42.1	32.0	52.3	44.8	0.0
Neurological disorders	8.6	14.7	20.0	11.4	10.3	0.0
Hematological disorders	73.4	74.7	88.0	86.4	82.8	100.0
Immunologic disorders	61.4	69.9	64.0	70.5	65.5	50.0
Anti-DNA	47.2	45.2	44.0	59.1	37.9	50.0
Anti-Sm	18.9	20.4	12.0	20.5	27.6	0.0
Anticardiolipin	20.6	29.0	36.0	29.5	27.6	25.0
Lupus Anticoagulant false positive VDRL	3.2 1.6	7.5 4.3	16.0 4.0	4.5 2.3	0.0 0.0	0.0 0.0
ANA	97.6	100.0	100.0	100.0	96.6	100.0
Anti-Ro	42.2	36.1	19.0	66.7	59.3	75.0
Anti-La	13.7	9.6	4.8	20.5	22.2	50.0
Anti-RNP	30.4	36.1	14.3	30.8	33.3	0.0
Sjögren	12.2	9.9	8.3	7.1	14.3	25.0
APS	6.5	7.8	8.3	4.8	3.6	0.0
SLEDAI <sup>b</sup>	2 (0-36)	1 (0-10)	0 (0-4)	1 (0-16)	2 (0-16)	1 (0-8)
SLICC <sup>b</sup>	1 (0-5)	0 (0-3)	2 (0-5)	1 (0-7)	1 (0-8)	1 (0-4)

Abbreviations: A (wild type allele); O (allele B, C or D); ANA: antinuclear antibody; APS: antiphospholipid syndrome; SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; SLICC: systemic lupus international collaborating clinics; VDRL: venereal disease research laboratory test; n: number of patients

<sup>a</sup>Frequencies according to the presence of genotype<sup>b</sup>Median (minimum - maximum)

Statistical significance was considered with P value &lt;0.0024 with Bonferroni correction

**Table 5** Clinical and laboratory characteristics of SLE patients categorized by the presence of MBL variant allele

Patients' features <sup>a</sup>	European-derived (N=249)			African-derived (N=26)		
	B (%) n=79	C (%) n=18	D (%) n=48	B (%) n=19	C (%) n=15	D (%) n=3
Malar rash	55.6	50.0	46.7	58.8	33.3	33.3
Discoid rash	16.7	5.6	20.0	5.9	20.0	0.0
Photosensitivity	73.6	72.2	77.8	47.1	46.7	33.3
Oral ulcers	34.7	33.3	40.0	35.3	33.3	33.3
Arthritis	80.6	94.4	84.4	94.1	80.0	100.0
Serositis	32.4	44.4	31.1	35.3	46.7	100.0
Nephritis	45.8	38.9	31.1	17.6	53.3	66.7
Neurological disorders	15.3	16.7	20.0	0.0	20.0	0.0
Hematological disorders	73.6	77.8	88.9	94.1	80.0	66.7
Immunologic disorders	65.7	83.3	64.4	70.6	46.7	100.0
Anti-DNA	40.0	55.6	46.7	35.3	33.3	100.0
Anti-Sm	15.7	22.2	15.6	29.4	13.3	33.3
Anticardiolipin	31.4	38.9	33.3	23.5	33.3	33.3
Lupus Anticoagulant false positive VDRL	8.6 4.3	11.1 5.6	13.3 4.4	0.0 0.0	0.0 0.0	0.0 0.0
ANA	100.0	100.0	100.0	100.0	93.3	100.0
Anti-Ro	34.5	41.2	21.4	76.5	30.8	100.0
Anti-La	12.1	5.9	4.8	29.4	15.4	66.7
Anti-RNP	31.0	29.4	23.8	35.3	15.4	33.3
Sjögren	10.3	5.9	11.4	5.9	0.0	0.0
APS	7.4	12.5	9.1	17.6	14.3	0.0
SLEDAI <sup>b</sup>	0 (0-16)	3 (0-10)	2 (0-12)	0 (0-4)	2 (0-10)	2 (0-4)
SLICC <sup>b</sup>	1 (0-5)	2 (0-8)	1 (0-4)	0 (0-5)	1 (0-3)	3 (0-5)

Abbreviations: B, allele B; C, allele C; D, Allele D; ANA: antinuclear antibody; VDRL: venereal disease research laboratory test; APS: antiphospholipid syndrome; SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; SLICC: systemic lupus international collaborating clinics; N: number of patients; n: number of alleles

<sup>a</sup>Frequencies according to the presence of mutant allele

<sup>b</sup>Median (minimum - maximum)

Statistical significance was considered with P value <0.0024 with Bonferroni correction



## The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus

Odirlei André Monticielo · Tamara Mucenic ·  
Ricardo Machado Xavier ·  
João Carlos Tavares Brenol · José Artur Bogo Chies

Received: 1 November 2007 / Revised: 3 January 2008 / Accepted: 4 January 2008  
© Clinical Rheumatology 2008

**Abstract** Susceptibility to systemic lupus erythematosus (SLE) is associated with genetic, hormonal, immunological, and environmental factors. Many genes have been related with the appearance of SLE, including several loci that code different complement components and their receptors. Some genetic deficiencies of complement molecules are strongly associated with SLE, probably because these deficiencies could cause decreased clearance of apoptotic cell material. As a consequence of the apoptotic material accumulation, high levels of autoantigens can be presented inappropriately to the immune system in an inflammatory context, resulting in an imbalance on the mechanisms of immunological tolerance, immune system activation, and autoantibody production. Recent studies proposed a role to the mannose-binding lectin (MBL) in the SLE pathogenesis. This protein activates the complement system, and the presence of several polymorphisms at the promoter and coding regions of the *MBL-2* gene determines alterations at the plasma levels of MBL. Some of these polymorphisms have been

associated with SLE susceptibility, as well as with clinical and laboratory typical features of this disease, cardiovascular events, and infections. Besides, it has been described that the presence of anti-MBL autoantibodies in sera of SLE patients can influence MBL plasma levels and its functional activity.

**Keywords** Complement · Genetics · Immunology · Mannose-binding lectin · Risk factors · Systemic lupus erythematosus

### Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune inflammatory disease that involves many organs and systems. It is characterized by autoantibody production mainly directed against nuclear antigens and immune complex formation and deposition, which lead to intense inflammatory response and tissue damage.

The etiopathogenesis of SLE remains unclear, but it is probably multifactorial with susceptibility related to genetic, hormonal, immunological, and environmental factors. It is thought that interactions among these factors contribute to the development of SLE. A combination of genes, instead of a single gene, predisposes to immunological disorder that, at a given moment, leads to defective mechanisms of immunological tolerance, allowing antibody production against autoantigens, immune complex formation, and deposition. Genetic deficiencies of complement components, especially of early components of the classical pathway ( $C_1q$ ,  $C_1r$ ,  $C_1s$ ,  $C_2$ , and  $C_4$ ), are strongly associated with SLE [1]. Defective clearance of apoptotic material could be a consequence of these deficiencies, determining prolonged exposure of autoantigens to the immune system and antibody generation against them.

O. A. Monticielo · T. Mucenic · R. M. Xavier · J. C. T. Brenol  
Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine,  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Porto Alegre, Brazil

J. A. B. Chies  
Department of Genetics,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Porto Alegre, Brazil

O. A. Monticielo (✉)  
Serviço de Reumatologia do Hospital de  
Clínicas de Porto Alegre—HCPA,  
Rua Ramiro Barcelos, 2350—Largo Eduardo Zaccaro Faraco,  
Sala 645, 6º andar,  
Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90035-903, Brazil  
e-mail: omonticielo@yahoo.com.br

The mannose-binding lectin (MBL) gene (*MBL-2*) has emerged as a candidate for SLE susceptibility due to the MBL role in innate immunity and possible association between its deficiency and autoimmune diseases. MBL is able to bind to apoptotic cell debris and is involved in the phagocytosis of apoptotic cells by macrophages. Some polymorphic variants, both at the promoter region and the coding region of the *MBL-2* gene, are associated with MBL deficiency. Several studies have observed a high occurrence of these polymorphic variants among SLE patients. Furthermore, different studies observed the association of some *MBL-2* polymorphic variants with specific clinical features in SLE patients, although the variety of clinical features and human populations studied made data interpretation rather difficult. Recently, the influence of anti-MBL autoantibodies on serum levels of MBL and its relationship with SLE have also been discussed.

In this study, we reviewed the possible involvement of MBL in SLE development, clinical manifestations, and outcomes, with special attention to associated studies of *MBL-2* gene polymorphisms.

### Genetic susceptibility to SLE

Several lines of evidence suggest that genetic factors play an important role in the development of SLE. There is a high concordance rate of SLE between monozygotic twins, about 24–58%, although among dizygotic twins this rate is below 10% [2, 3]. Almost 10% of the relatives of patients with SLE have the disease [4]. A recent review showed that 27% of 195 children born from mothers with lupus had a positive test for antinuclear antibodies without clinical SLE [5]. Also, a high prevalence of other autoimmune diseases can be observed among SLE patients.

A genetic predisposition to the development of SLE may be correlated with the inheritance of genes for susceptibility clustered in specific chromosomal regions; nevertheless, the inheritance model is not monogenic. During the last years, several studies have identified potential genetic markers associated with SLE [6–10]. These included different genes in specific chromosomal regions (particularly in chromosome 1), major histocompatibility complex alleles HLA-B8, HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DQW1, and HLA-DMA\*0401, deficiencies in components of the complement system, such as C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>1q</sub>, and CR1 receptor, and polymorphic variants of the *MBL-2* gene. Several studies have implicated alleles of genes coding for Fc receptors, C-reactive protein, several cytokines and cytokine receptors, null-alleles of the *GSTM1* gene that codes the enzyme glutathione S-transferase mu, as well as genes related to abnormal activity of protein kinases, phosphatases, intracellular signaling molecules, and chemokines in SLE suscepti-

bility. Nevertheless, some of these associations with genetic markers are restricted to patients of certain populations and/or ethnic backgrounds. Functional consequences of the presence of such variants include immune system disorder, protein degradation, abnormal peptide transport across cell membranes, defects on complement pathways, reticuloendothelial dysfunction, abnormal immunoglobulin production, cell apoptosis and abnormal production, and release of hormones [11]. Currently, there is substantial interest in the genetic effects associated with specific clinical features in SLE patients and their severity and outcome.

### Impaired functions of the immune system in SLE

Defective immunity in SLE patients leads to an unbalanced control of the self-tolerance. As a general rule, these abnormalities can promote autoantigen recognition, T and B cell activations, cytokine secretion, and production of autoantibodies. Specifically, several alterations have been already described in the immune system of SLE patients [10, 12, 13]: (a) reduced frequency of cytotoxic and suppressor T cells and impaired generation of polyclonal T cells with cytolytic activity; (b) defects at the level of B cell tolerance, abnormal B cell receptor signaling, and global B cell hyperactivity with high production of polyclonal gammaglobulin; (c) antigen-receptor signaling abnormality manifested by increased calcium responses and hyperphosphorylation of several cytosolic protein substrates and low activity of nuclear factor kappa beta; (d) elevated circulating levels of interferon alpha and gamma, interleukins 1-beta, 6, 4, 8, and 10, tumor necrosis factor-alpha, and chemoattractant cytokines; (e) defects in phagocytosis with increased level of circulating apoptotic cell; and (f) abnormal toll-like receptors 7 and 9 signaling and increased expression of TLR-9 on peripheral blood B cells and plasma cells.

In the following sections, we will focus on observed abnormalities of the complement system and, more specifically, on the possible association of different variants of the *MBL-2* gene and SLE.

### The complement system

The complement system is a biochemical cascade, composed of over 20 different proteins, and is part of the innate branch of the immune system. It plays an important role in inflammatory responses. It contributes to microorganism opsonization and destruction, leukocyte activation, and cellular lysis. Particularly interesting in the context of the SLE is that it is responsible for the clearance of immune complexes, and the complement activation is the central

key in mechanisms of tissue injury and organ dysfunction. It can be activated by three different pathways: the classical pathway, the alternative pathway, and the lectin pathway. The classical pathway is activated by immune complexes, involving components C1, C2, and C4. The alternative pathway depends on C3b deposited on microorganisms' surfaces, B and D factors, and properdin (P) for the complement activation. The lectin pathway is activated by binding of MBL to sugars (mannose residues) present on the surface of certain bacteria. This pathway has similarities to the classical pathway. This pathway can also be activated by proteins called ficolins, which bind sugars, too. Both MBL and ficolins circulate in association with a group of MBL-associated serine proteases (MASP), which contribute to their functional activity (Fig. 1) [14]. There are several acquired and inherited deficiencies associated with these pathways that can potentially trigger autoimmune disorders or susceptibility to infections.

#### Structure and function of mannose-binding lectin

MBL is a serum protein produced in the liver and is a key molecule in innate immunity. It is an acute phase protein, and its expression is increased in inflammatory states. It belongs to a family of proteins called collectins, which possess collagenous regions and lectin domains. It is structurally homologous to C<sub>1</sub>q, and it activates the lectin pathway of the complement. It is composed of three identical polypeptides with a molecular weight of around 32 kDa. Each polypeptide consists of a carbohydrate recognition domain, a neck domain, a collagenous domain, and a cysteine-rich region. It is functionally similar to C<sub>1</sub>q, playing an important role in innate immunity by opsonizing mannose-rich microorganisms and activating macrophages and the complement cascade. MBL associates with MASP, especially MASP-1 and -2, forming a complex. These proteins are homologous to C<sub>1</sub>r and C<sub>1</sub>s of the classical pathway of the complement, and the cascade they provoke results in the generation of the C<sub>3</sub> convertase, which is

similar to other convertases of different complement pathways [14].

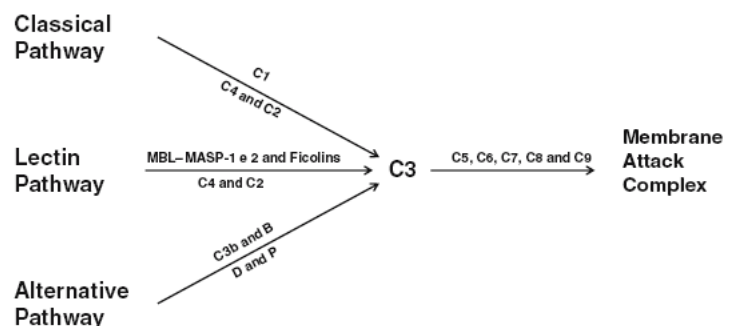
The role of MBL in host defense has been well defined. It could activate the complement system after binding different microorganisms. There are descriptions about opsonophagocytosis mechanisms involving MBL molecule and cell surface receptors, inflammatory modulation, and clearance of apoptotic cells. The deficiency of MBL protein, as well as deficiencies of other complement system molecules, can lead to abnormal antigen presentation to immunological system. This fact has been described as a possible mechanism involved in the pathogenesis of SLE. Low plasma level of MBL has been related to genetic abnormalities and antibody anti-MBL production.

There are two human MBL genes. *MBL-1* is a pseudogene, and only *MBL-2* encodes a protein product. *MBL-2* has been mapped to chromosome 10q11.2–21 and contains 4 exons [15]. Exon 1 encodes the signal peptide, a cysteine-rich region and part of glycine-rich collagenous region. Exon 2 encodes the remainder of the collagenous region, and exon 3 encodes an alpha-helical coiled-coil structure, which is known as the “neck” region. The carbohydrate recognition domain is encoded by exon 4 [16, 17] (Fig. 2). The promoter region of this gene contains a number of regulatory elements, which affect the transcription rate.

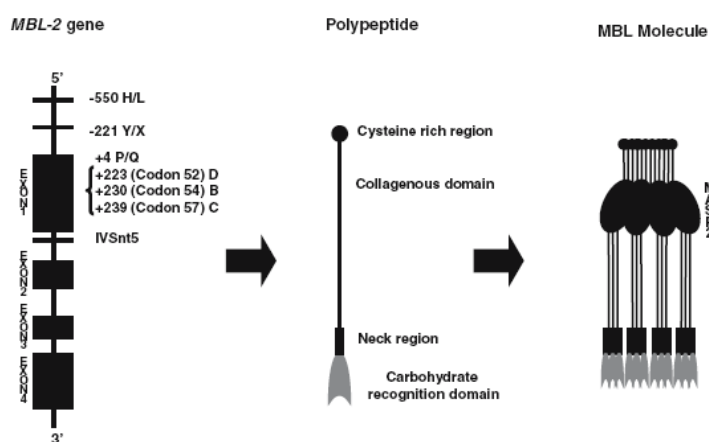
#### Mannose-binding lectin deficiency and SLE

Several different polymorphic alleles which result in MBL deficiency were described for *MBL-2*. Three functional single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were located at exon 1: at codons 54 (allele B), 57 (allele C), and 52 (allele D). At codon 54, a G to A substitution alters an aspartic acid to a glycine at the protein level. At codon 57 there is a G to A substitution (glycine to glutamic acid), and at codon 52 a C to T substitution leads to a change from arginine to cysteine. These substitutions lead to structural alterations that determine low MBL plasma levels [18–20]. Although

**Fig. 1** Complement system and its three activation pathways. The *classical pathway*, *alternative pathway*, and *lectin pathway* converge to C<sub>3</sub> convertase generation that cleaves C<sub>3</sub>. The lytic pathway (C<sub>5–9</sub>) is common to all activation pathways and results in *membrane attack complex*



**Fig. 2** Structure of the human *MBL-2* gene, encoded protein product, and MBL molecule with tetramer of human MBL structural subunits. Each structural unit is composed of three identical 32-kDa polypeptides. (Modified from Dommett et al. [14])



allele A (wild type at these three positions and responsible for normal plasma levels of MBL) is generally the most frequent allele, differences on allele distribution are observed in different human populations when considering the ethnic background. Thus, allele B has a prevalence of 26% in European-derived populations, and allele C is found at a frequency of 50–60% among African descendants [19]. Allele D generally has low prevalence among the studied populations [21]. Besides these exon 1 variants, SNPs at promoter regions -550 (alleles H/L), -221 (alleles X/Y), and +4 (alleles P/Q) were identified [22]. Subsequently, four common haplotypes were described for these promoter variants: LXP, LYP, LYQ, and HYP, where HYP is associated with medium to high levels of MBL and LXP is associated with low levels of this protein [23]. These promoter haplotypes are in strong linkage disequilibrium with SNPs at exon 1, resulting in seven common extended haplotypes, namely: HYPA, LYPA, LYQA, LXPA, HYPD, LYPB, and LYQC [22]. Other polymorphisms have been described at the *MBL-2* gene, but their clinical significance has not been determined. For example, there is a polymorphism involving a G to A substitution in the position five of the first intron (IVSnt5). This variant was first described in Afro-descendant patients with sickle cell anemia. This polymorphism presents a relation with the LY haplotype and is associated with lower plasma MBL levels than HY haplotype [24].

Besides the well-established relation between low levels of MBL and bacterial infections, several studies suggest a possible association between deficient MBL and autoimmune disease susceptibility, including SLE (Table 1). The mechanisms involved in the pathogenesis of SLE could be impaired clearance of apoptotic cells, which results in overexpression of autoantigens or a higher infection predisposition, which are believed to be some of the causes of SLE. Initially, in 1995, Davies et al. studied European

descendants with SLE and found a higher frequency of allele B in SLE patients (41%) as compared to controls (30%) [25]. Three years later, the same authors demonstrated that the frequency of alleles B or C was higher among South African SLE patients as compared to controls (60% versus 46%) [26]. In 1996, Lau et al. observed among Chinese SLE patients a higher frequency of allele B as compared to controls (33% versus 23%) [27]. Horiuchi et al., studying Asian patients, did not find difference for allele B, and Garred et al. and Garcia-Laorden et al., studying Caucasian patients, had similar results [28–30]. Sullivan et al. showed a significantly higher prevalence of allele B (16.3% versus 8.7%) and allele C (12.5% versus 4.7%) in Afro-derived North American SLE patients [31]. In 2003, the same authors found a higher prevalence of allele C in Euro-derived patients and a higher frequency of allele B and certain promoter haplotypes in Afro-derived patients as compared to controls [32]. Villarreal et al. observed in Spanish patients a prevalence of allele B 2.2 times higher in SLE patients as compared to controls. In this study, the frequencies of alleles B, C, and D were, respectively, 30.8%, 5%, and 10.8% in SLE patients and 16.7%, 2.2%, and 12.3% in controls. As it can be observed, there was a low prevalence of allele C in this population [33]. Carthy et al. found odds ratio of 1.9 for the presence of allele B in SLE patients in Greece [34]. Ip et al., Tsutsumi et al., and Huang et al. showed significantly higher frequency of haplotype L/X and allele B in Asian patients [35–37]. Takahashi et al. evaluated Japanese patients with SLE and verified that the frequency of allele B in homozygous individuals was 6%, which was significantly higher than in controls [38]. Navarra et al. found a tendency of increased prevalence of promoter variant haplotype LX among Filipinos with SLE (30.4% versus 23.9%) [39], although in this population an uncommon frequency of HX haplotype was observed, as pointed out by Chies [40].

**Table 1** Characteristics of the studies on the association of MBL and SLE

Population ancestry	Sample		Polymorphisms studied	Main results	References
	SLE patients	Controls			
Caucasian	102	136	Allele B	Not significant	[25]
Caucasian	41	59	Allele B	$P < 0.05$ for allele B	[34]
Caucasian	91	250	Allele B	Not significant	[29]
Caucasian	125	138	Alleles B, C, D, X, and L Haplotypes L/X and L/Y	Alleles B and L significant	[33]
Caucasian	75	155	Alleles B and C	$P < 0.01$ for allele C	[32]
Caucasian	89	188	Allele B	Not significant	[28]
Caucasian	96	96	Alleles B and C	Not significant	[41]
Caucasian	285	200	Alleles B and C	Not significant	[41]
Caucasian	114	104	Alleles B, C, D, and X	Not significant	[42]
African	92	86	Alleles B, C, L, and X Haplotype L/X and L/Y	Alleles B and C significant	[31]
African	50	87	Alleles B and C	Not significant	[26]
African	85	57	Alleles B and C	$P < 0.05$ for allele B	[32]
Asian	111	123	Allele B	Not significant	[27]
Asian	112	110	Alleles L and X Haplotypes L/X and L/Y	$P < 0.05$ for haplotype L/X	[36]
Asian	95	105	Allele B	Not significant	[30]
Asian	157	129	Allele B	$P < 0.05$ for allele B homozygosity	[37]
Asian	41	111	Alleles B, L, and X Haplotypes L/X and L/Y	$P < 0.05$ for haplotype L/X	[35]
Asian	147	160	Allele B	$P < 0.05$ for allele B homozygosity	[38]
Caucasian	130	142	Alleles B, C, and D	Not significant	[46]
African Others Not related	144	138	Alleles H, Y, L, and X	Not significant	[39]

Recently, Lee et al. published a meta-analysis reviewing all publications until 2005. Three ethnic populations were included: Euro descendants, Afro descendants, and Asians, and the authors concluded that allele B and polymorphisms at the promoter region, specifically those found at positions  $-550$  and  $-221$ , were risk factors of SLE development, with a relative risk of 1.40, 1.48, and 1.22, respectively [41]. Thus, different variants were implicated in different studies and, although the association between MBL deficiency and SLE was weak, all studies suggest that lower MBL levels are associated with the development of SLE.

Moreover, based on studies aiming to associate *MBL-2* polymorphisms and SLE susceptibility, another approach includes studies which try to correlate these genetic variants and clinical expression and/or laboratorial features of SLE. For example, although phenotypic and immunological features did not differ SLE from controls, Takahashi et al. observed higher frequency of infections and a decrease in  $C_3$  and  $CH_{50}$  in patients homozygous to allele B [38]. Font et al. showed that SLE patients with MBL deficiency had relative risk of cardiovascular diseases of 3.1, although the presence of antiphospholipid antibody in these patients had been a confusing factor [42]. Ohlenschlaeger et al. observed

a significant correlation among some allelic variants for MBL deficiency and increased risk of arterial thrombosis [43]. Calvo-Alen et al. observed an association between *MBL-2* allelic variants and cerebrovascular disease in Euro-derived SLE patients. It is important to point out that these authors suggest that the influence of *MBL-2* alleles on thromboembolic diseases depends on the ethnic background of the studied population [44]. Also considering clinical features on SLE, a study with SLE women in Canary Islands evidenced an association of MBL deficiency with low frequency of autoantibodies and delayed development of the disease [28]. Recently, Bertoli et al. published a study showing that carriers of variant alleles for *MBL-2* gene among North American patients with SLE had low levels of serositis, renal involvement, and antiphospholipid antibodies but higher prevalence of leucopenia [45]. Piao et al. found a significantly higher prevalence of anti-Smith antibody associated with genotypes A/B and A/C in a North American group of SLE patients. In the same study, although the presence of different variants at the coding region of the *MBL-2* gene polymorphism did not correlate with SLE development, homozygosity for MBL variants seems to represent a disease-modifying factor, particularly considering

renal involvement [46]. Finally, Mok et al. suggested that low serum MBL level predisposes Chinese SLE patients to infections, particularly bacterial ones [47]. It should be pointed out that not all studies indicate a strict correlation between functional MBL and the development of infections in SLE patients, as demonstrated by a lack of association between functional MBL serum levels or MBL pathway activity and major infections in SLE patients [48].

Another interesting fact involving MBL deficiency is the presence of anti-MBL autoantibodies in serum of SLE patients. This fact could explain the existence of MBL deficiency in patients without genetic abnormalities. It also could help to elucidate the differences between MBL serum concentrations in SLE patients with similar genetic mutation on *MBL-2* gene. However, the results of studies have been controversial. Anti-MBL autoantibodies may bind to MBL and decrease its serum level. On the other hand, these autoantibodies may bind MBL deposited in diverse tissues, contributing to tissue injury. Seelen et al. firstly demonstrated the presence of anti-MBL autoantibodies in SLE patients, but it did not result in low MBL concentration. They suggested a possible effect of anti-MBL on functional activity circulating MBL [49]. Takahashi et al. evidenced that titers of anti-MBL in Japanese patients with SLE were higher than those in healthy controls. No associations were apparent of titers of anti-MBL antibodies and genotypes of MBL gene (allele B), concentrations of serum MBL, or disease characteristics of SLE [50]. Recently, Mok et al. found IgG anti-MBL in 23.7% of SLE patients and 10% of the control group. Serum levels of IgG anti-MBL antibodies had positive correlation with MBL levels in these patients. IgM anti-MBL autoantibodies were found in a small fraction of patients, suggesting that the production of anti-MBL antibodies in SLE patients could be a specific-antigen-driven process and not a result of polyclonal activation in which IgM antibodies might be expected. Although the level of anti-MBL antibodies did not correlate with overall disease activity [51], a recent study identified significantly elevated titers of anti-MBL antibodies in SLE patients with quiescent disease (median European Consensus Lupus Activity Measurement score 2), and the authors suggested that these autoantibodies may play a pathogenic role in the development or perpetuation of autoimmunity in SLE [52]. However, at this stage, the real significance of anti-MBL in SLE patients still remains unclear and requires further investigation.

### Conclusion

Distinct *MBL-2* polymorphisms, both at the coding and the promoter regions, associated with low serum MBL levels, have been related to SLE patients with different ethnical

backgrounds, although some studies have failed to show significant differences between patients and controls. Some of these results are due to the limited number of patients. The influence of these polymorphisms on populations with specific ethnic background can determine different relative risks according to their interaction with distinct factors. Due to the high variability of frequencies of different *MBL-2* variants among different populations, attempts to increase the statistical power by grouping data from different studies and populations are quite difficult. Nevertheless, as previously discussed, besides the SLE predisposition, MBL low levels can be related to specific clinical features of this disease and to cardiovascular events and infections in SLE patients. Also, interactions between different polymorphisms, as well as other genes, in a patient could influence SLE clinical expression, severity, and outcomes. But, at this moment, all these data have not been clearly established. Lately, the role of anti-MBL autoantibodies has also been discussed and could partially explain the variations in MBL plasma levels and possible mechanism of immune complex formation and SLE development. Whether genetic abnormalities with MBL deficiency or anti-MBL autoantibody presence or both interactions are related to SLE susceptibility and its different clinic manifestations and prognosis need more clarifications.

The different mechanisms involved in SLE etiopathogenesis will be gradually decoded. Genetic factors represent part of the complex mechanisms that predispose to SLE development and determine the wide spectrum of clinical features characteristic of this disease. Advances in studying the role of *MBL-2* polymorphisms will undoubtedly contribute to a better comprehension of the etiopathogenesis of SLE.

### References

- Walport MJ (1993) The Roche Rheumatology Prize Lecture. Complement deficiency and disease. *Br J Rheumatol* 32(4):269–273
- Block SR et al (1975) Proceedings: twin studies in systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum* 18(3):285
- Deapen D et al (1992) A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 35(3):311–318
- Amett FC et al (1984) Systemic lupus erythematosus: current state of the genetic hypothesis. *Semin Arthritis Rheum* 14(1):24–35
- Murashima A et al (2004) Long term prognosis of children born to lupus patients. *Ann Rheum Dis* 63(1):50–53
- Croker JA, Kimberly RP (2005) Genetics of susceptibility and severity in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 17(5):529–537
- Fraser PA et al (2003) Glutathione *S*-transferase M null homozygosity and risk of systemic lupus erythematosus associated with sun exposure: a possible gene–environment interaction for autoimmunity. *J Rheumatol* 30(2):276–282
- Morel J et al (2003) Polymorphism of HLA-DMA and DMB alleles in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 30(7):1485–1490

9. Tsao BP (2004) Update on human systemic lupus erythematosus genetics. *Curr Opin Rheumatol* 16(5):513–521
10. Fairhurst AM, Wandstrat AE, Wakeland EK (2006) Systemic lupus erythematosus: multiple immunological phenotypes in a complex genetic disease. *Adv Immunol* 92:1–69
11. Theofilopoulos AN (1995) The basis of autoimmunity. Part II. Genetic predisposition. *Immunol Today* 16(3):150–159
12. Pugh-Bernard AE, Cambier JC (2006) B cell receptor signaling in human systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 18(5):451–455
13. Tsokos GC et al (2000) Immune cell signaling in lupus. *Curr Opin Rheumatol* 12(5):355–363
14. Dommett RM, Klein N, Turner MW (2006) Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* 68(3):193–209
15. Madsen HO et al (1994) A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* 40(1):37–44
16. Sastry K et al (1989) The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. *J Exp Med* 170(4):1175–1189
17. Taylor ME et al (1989) Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. *Biochem J* 262(3):763–771
18. Garred P et al (2003) Mannose-binding lectin deficiency—revisited. *Mol Immunol* 40(2–4):73–84
19. Lipscombe RJ et al (1992) High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Hum Mol Genet* 1(9):709–715
20. Sumiya M et al (1991) Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 337(8757):1569–1570
21. Lipscombe RJ et al (1996) Mutations in the human mannose-binding protein gene: frequencies in several population groups. *Eur J Hum Genet* 4(1):13–19
22. Madsen HO et al (1995) Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* 155(6):3013–3020
23. Madsen HO et al (1998) Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *J Immunol* 161(6):3169–3175
24. Neonato MG et al (1999) Genetic polymorphism of the mannose-binding protein gene in children with sickle cell disease: identification of three new variant alleles and relationship to infections. *Eur J Hum Genet* 7(6):679–686
25. Davies EJ et al (1995) Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 38(1):110–114
26. Davies EJ et al (1998) Mannose-binding protein gene polymorphism in South African systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 37(4):465–466
27. Lau YL et al (1996) Mannose-binding protein in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 39(4):706–708
28. Garcia-Laorden MI et al (2003) Mannose binding lectin polymorphisms as a disease-modulating factor in women with systemic lupus erythematosus from Canary Islands, Spain. *J Rheumatol* 30(4):740–746
29. Garred P et al (1999) Mannose-binding lectin polymorphisms and susceptibility to infection in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 42(10):2145–2152
30. Horiuchi T et al (2000) Mannose binding lectin (MBL) gene mutation is not a risk factor for systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) in Japanese. *Genes Immun* 1(7):464–466
31. Sullivan KE et al (1996) Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 39(12):2046–2051
32. Sullivan KE et al (2003) Analysis of polymorphisms affecting immune complex handling in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 42(3):446–452
33. Villareal J et al (2001) Mannose binding lectin and FcγRIIIa (CD32) polymorphism in Spanish systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford)* 40(9):1009–1012
34. Carthy D et al (1997) Mannose-binding lectin gene polymorphism in Greek systemic lupus erythematosus patients. *Br J Rheumatol* 36(11):1238–1239
35. Huang YF et al (2003) Increased frequency of the mannose-binding lectin LX haplotype in Chinese systemic lupus erythematosus patients. *Eur J Immunogenet* 30(2):121–124
36. Ip WK et al (1998) Association of systemic lupus erythematosus with promoter polymorphisms of the mannose-binding lectin gene. *Arthritis Rheum* 41(9):1663–1668
37. Tsutsumi A et al (2001) Mannose-binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. *Genes Immun* 2(2):99–104
38. 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(2):311–314
39. Navarra SV et al (2007) Increased frequency of mannose-binding lectin promoter LX haplotype among Filipinos with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 16(2):147–148
40. Chies JA (2007) Letter to the editor: on the haplotypic frequencies of the MBL2 gene among human populations. *Lupus* 16(10):838
41. Lee YH et al (2005) The mannose-binding lectin gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus: two case-control studies and a meta-analysis. *Arthritis Rheum* 52(12):3966–3974
42. Font J et al (2006) Association of mannose-binding lectin gene polymorphisms with antiphospholipid syndrome, cardiovascular disease and chronic damage in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 46:76–80
43. Ohlenschlaeger T et al (2004) Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 351(3):260–267
44. Calvo-Alen J et al (2006) Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort: XXXIV. Deficient mannose-binding lectin exon 1 polymorphisms are associated with cerebrovascular but not with other arterial thrombotic events. *Arthritis Rheum* 54(6):1940–1945
45. Bertoli AM et al (2006) Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort: XXXVI. Influence of mannose-binding lectin exon 1 polymorphisms in disease manifestations, course, and outcome. *Arthritis Rheum* 54(5):1703–1704
46. Piao W et al (2007) Mannose-binding lectin is a disease-modifying factor in North American patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 34(7):1506–1513
47. Mok MY et al (2007) Mannose-binding lectin and susceptibility to infection in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 34(6):1270–1276
48. Bultink IE et al (2006) Deficiency of functional mannose-binding lectin is not associated with infections in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 8(6):R183
49. Seelen MA et al (2003) Autoantibodies against mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 134(2):335–343
50. Takahashi R et al (2004) Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 136(3):585–590
51. Mok MY et al (2004) Antibodies to mannose binding lectin in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 13(7):522–528
52. Shoenfeld Y et al (2007) Autoantibodies against protective molecules-C1q, C-reactive protein, serum amyloid P, mannose-binding lectin, and apolipoprotein A1: prevalence in systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* 1108:227–239

## 6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O presente estudo encontrou um significativo aumento do polimorfismo *R52C* (alelo D) em pacientes euro-descendentes com LES quando comparados com controles saudáveis. Os indivíduos portadores deste alelo apresentaram um aumento de três vezes no risco de ter a doença. Este achado parece próprio da população estudada, visto que até o momento não havia sido encontrada uma significativa associação deste alelo com LES em outros estudos.

Os polimorfismos *G57E* (alelo C) e *G54D* (alelo B) não apresentaram frequência significativamente diferente entre os casos e controles, não configurando fator de risco para LES nesta população.

Os polimorfismos *IVSnt5* e *R52H* não foram encontrados nos indivíduos estudados, fato que não surpreendeu, pois ambos foram descritos em populações africanas e raramente seriam encontrados em pessoas euro-descendentes.

As variantes alélicas estudadas não apresentaram influência nas manifestações clínicas e laboratoriais dos pacientes com LES. Isto comprova que nesta população os polimorfismos *G57E*, *G54D* e *R52C* não interferiram na expressão fenotípica da doença.



## **7 ANEXOS**

## 7.1 ANEXO I - CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

### CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (1):

1. **Rash malar:** eritema fixo, plano ou elevado, nas eminências malares, tendendo a poupar a região nasolabial.

2. **Rash Discóide:** placas eritematosas elevadas, ocorrendo cicatrização atrófica nas lesões antigas.

3. **Fotossensibilidade:** rash cutâneo resultante de reação incomum ao sol, por história do paciente ou observação do médico.

4. **Úlcera oral:** ulceração oral ou nasofaríngea, geralmente não dolorosa, observada pelo médico.

5. **Artrite:** artrite não erosiva envolvendo 2 ou mais articulações periféricas, caracterizada por dor à palpação, edema ou derrame.

#### 6. Serosite:

(a) pleurite – história convincente de dor pleurítica ou atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural.

*ou*

(b) pericardite – documentada por ECG ou atrito ou evidência de derrame pericárdico.

#### 7. Alteração renal:

(a) proteinúria persistente > 0,5 g por dia ou > 3+ se não quantificada.

*ou*

(b) cilindros celulares: podem ser hemáticos, granulares, tubulares ou mistos.

#### 8. Alteração neurológica:

(a) convulsão – na ausência de drogas implicadas ou alterações metabólicas conhecidas (ex. uremia, cetoacidose, distúrbios hidroeletrólíticos).

*ou*

(b) psicose - na ausência de drogas implicadas ou alterações metabólicas conhecidas (ex. uremia, cetoacidose, distúrbios hidroeletrólíticos).

#### 9. Alteração hematológica:

(a) anemia hemolítica com reticulocitose.

*ou*

(b) leucopenia - < 4000/mm<sup>3</sup> total em 2 ou mais ocasiões.

*ou*

(c) linfopenia - < 1500/mm<sup>3</sup> em 2 ou mais ocasiões.

*ou*

(d) trombocitopenia - < 100 000/mm<sup>3</sup> na ausência de drogas causadoras.

**10. Alteração imunológica:**

(a) anti-DNA – anticorpo ao DNA nativo em títulos anormais.

*ou*

(b) Anti-Sm – presença do anticorpo ao antígeno nuclear Sm.

*ou*

(c) Achados positivos de anticorpos antifosfolípidos baseados em (1) concentração sérica anormal de anticardiolipina IgG ou IgM, (2) teste positivo para anticoagulante lúpico usando teste-padrão ou (3) VDRL falso positivo por pelo menos 6 meses e confirmado por FTA-Abs.

**11. Anticorpo antinuclear (FAN):**

Título anormal do FAN por imunofluorescência ou método equivalente em qualquer momento, na ausência de drogas sabidamente associadas ao lúpus induzido por drogas.

Para fins de classificação de doença, o (a) paciente deve apresentar pelo menos 4 dos 11 critérios.

## 6.2 ANEXO II - PROTOCOLO DE PESQUISA

### PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DO AMBULATÓRIO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

IDENTIFICAÇÃO: \_\_\_\_\_ n° \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_

Sexo:  F  M Raça:  Branco  Não branco

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ Estado civil: \_\_\_\_\_

Naturalidade/Procedência: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ Telefones: \_\_\_\_\_

DATA DO INÍCIO DOS SINTOMAS: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

DATA DO DIAGNÓSTICO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

MANIFESTAÇÕES INICIAIS NO DIAGNÓSTICO: \_\_\_\_\_

INÍCIO DO ACOMPANHAMENTO NO HCPA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

ÓBITO:  S  N DATA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

CAUSA: \_\_\_\_\_

#### CRITÉRIOS PARA CLASSIFICAÇÃO PARA LES (ACR 1997)

- Rash malar
- Rash discóide
- Fotossensibilidade
- Úlceras orais/nasais
- Artrite)
- Serosíte:  Pleurite  Pericardite
- Doença renal: Classe: \_\_\_\_\_ (data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)  sem biópsia  
Índice de atividade: \_\_\_/\_\_\_ Índice de cronicidade: \_\_\_/\_\_\_
- Doença neurológica:  Psicose  
 Convulsão
- Hematológico:  Anemia hemolítica  
 Leucopenia / linfopenia  
 Plaquetopenia
- FAN: Titulação: \_\_\_\_\_ Padrão: \_\_\_\_\_
- Imunológico:  anti DNA  anti Sm  
 aCL: IgG: \_\_\_\_\_ IgM: \_\_\_\_\_  AL  VDRL

#### ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS ASSOCIADAS

- Hipertensão  Diabetes  Obesidade (IMC: \_\_\_\_\_)  Dislipidemia
- SAAF
- Síndrome de Sjögren
- Eventos tromboembólicos ( AVC,  IAM,  Claudicação,  Angina,  TVP,  outros: \_\_\_\_\_)
- História obstétrica: G: \_\_\_/P: \_\_\_/C: \_\_\_/A: \_\_\_ obs.: \_\_\_\_\_
- Tabagismo  Ex-tabagismo  Etilismo
- Outras doenças auto-imunes associadas: \_\_\_\_\_
- ENA \_\_\_\_\_
- Lupus band test: \_\_\_\_\_

#### TRATAMENTO REALIZADO

- Corticoterapia
- Azatioprina
- Micofenolato mofetil
- Rituximabe
- ACO/TRH
- Estatina
- Pulsoterapia
- Cloroquina / Hidroxicloroquina
- Dapsona
- AAS
- CaCo3/D3
- Danazol
- Ciclofosfamida
- Metotrexate
- Ciclosporina
- Anticoagulante
- Bisfosfonados
- Anti-hipertensivos

## 6.3 ANEXO III - TERMO DE CONSENTIMENTO

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

#### **ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DA LECTINA LIGADORA DA MANOSE EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

##### **POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?**

Os portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) apresentam fatores genéticos implicados no seu surgimento e evolução. Este estudo está sendo realizado para tentar identificar possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de LES e existência de correlação com as manifestações clínicas.

##### **DE QUE CONSTA O ESTUDO?**

Será coletada uma amostra de sangue que será destinada à avaliação genética proposta pelo presente estudo. Mediante consentimento do paciente, também serão coletados 10 ml de sangue, que serão centrifugados e cujo soro resultante será armazenado, integrando a soroteca de LES, visando pesquisas futuras sem a identificação do paciente. O uso de parte do sangue para quaisquer outras finalidades é vetado.

##### **QUAIS SÃO AS VANTAGENS DA PARTICIPAR NESTE ESTUDO?**

1. Avaliar fatores genéticos implicados na etiopatogênese do LES.
2. Colaborar para o avanço e progresso do conhecimento sobre LES e alterações genéticas associadas.

##### **QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS DA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO?**

1. Comparecer ao hospital.
2. Realizar punção venosa para coleta de sangue, que pode causar dor temporária e coleção de sangue na pele (equimose ou hematoma).

##### **HÁ A POSSIBILIDADE DE ESTE ESTUDO CONTINUAR?**

Este estudo foi planejado para encerrar em dezembro de 2008 e para avaliar o risco genético apenas através dos genes da lectina ligadora da manose. No entanto, é possível que mais genes e outros fatores relacionados ao surgimento do LES possam

ser analisados futuramente. Para tal, o paciente, através de um novo contato com a equipe pesquisadora, deverá autorizar novamente o uso da amostra já coletada e o novo projeto deverá ser avaliado pela Comissão de Ética em Pesquisa da instituição e Conselho Nacional de Ética em Pesquisa. Outra possibilidade é a de um novo contato com o paciente em 5 ou 10 anos para verificar a evolução da doença.

#### **DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE**

- A. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma.
- B. A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir não participar.
- C. A decisão de não participar não interferirá no acompanhamento normal dos pacientes no Ambulatório, na Emergência nem na Internação do Hospital de Clínicas.
- D. O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.

#### **COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO**

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, assinala com um “X” apenas uma das opções abaixo:

(    ) Autorizo o uso dos dados desta pesquisa para análise dos genes relacionados à lectina ligadora da manose.

(    ) Autorizo o uso dos dados desta pesquisa para análise dos genes relacionados à lectina ligadora da manose. e de outros genes relacionados etiopatogênese do LES que possam ser considerados relevantes dentro desta linha de pesquisa, desde que pelo mesmo grupo de pesquisa.

Paciente: \_\_\_\_\_

Registro: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_.

Pesquisadores responsáveis:

Prof. Dr. João Carlos Tavares Brenol: Telefone: (051) 2101 8340; FAX: (051) 3331 3834

Odirlei André Monticielo: Telefone: (051) 9652 6170

Comitê de Pesquisa e Ética em Saúde: Telefone: (051) 2101 8304