

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**ANÁLISE DE VARIANTES POLIMÓRFICAS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE
SIRT1 EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Camila Rosat Consiglio

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular da UFRGS
como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em
Genética e Biologia Molecular.**

Orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Porto Alegre

Março 2013

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Agências financiadoras:

- CNPq
- CAPES
- FAPERGS

Instituição de origem:

- Laboratório de Imunogenética
Departamento de Genética
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Instituições colaboradoras:

- Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)
- Hospital Nossa Senhora da Conceição

Agradecimentos

Gostaria de agradecer imensamente a algumas pessoas que tornaram este capítulo da minha vida, o mestrado, uma aventura agradável, divertida, entusiasmante e repleta de ensinamentos:

Aos meus pais, que constituem a base de tudo que importa para mim na vida. Agradeço pelo amor, companhia, paciência, otimismo e incentivo constante. Eu me espelho em vocês.

Às minhas queridas Vó e Oma pelo carinho e amor infinito!

Ao meu gato Luke, por me acompanhar nos estudos de genética há 4 anos.

Aos meus colegas de laboratório:

À Ju, que se tornou uma grande amiga. Companheira de estudos para passar no mestrado, de comemorações pelas aprovações no mestrado e por publicações de artigos, de festas e encontros divertidos entre as amigas, de congressos, de compras na volta da praia, de longas conversas, confidências e de muita diversão. Ju, o meu mestrado nunca teria sido tão legal se não tivéssemos sido colegas de mestrado e laboratório!

À Tássia e Jacque, grandes amigas e colegas de laboratório com as quais tive o imenso prazer de fazer o mestrado junto. Este período de mestrado também não teria sido tão divertido se não fosse por vocês!

Ao Mau, por sempre me dar câimbras nas bochechas de tanto rir. Admiro muito você, especialmente pelo seu bom humor e alegria contagiante.

À Nadine, a anjinha do laboratório. Agradeço por ser sempre otimista, querida e uma ótima amiga em todos os momentos!

À Lia, Bianca, Francis, Ana Karine, Pri Vianna e Giovana. Colegas maravilhosas de laboratório que divertiram muito no laboratório, em jantas, em conversas na cozinha pós-RU comendo a “trufa da tia”, etc.

Ao pessoal da bioinformática, por sempre saberem o que fazer quando o Endnote ou algum outro programa não funciona. E também, é claro, por serem sempre muito queridos e divertidos.

Ao Tiago Veit, meu “ex-co-orientador” querido, que sempre tem boa vontade para ajudar (e um “Dream Theater” pra ouvir no carro, claro).

Aos antigos companheiros de laboratório Nayê, Bruno, Gabi, Pietra, Paula, FeRa, Tiago Dalberto, Pedro, Bel e Camile. Vocês fazem muita falta no laboratório!

Ao meu orientador, Zéca, que eu admiro muito. Obrigada por estimular, revisar e discutir, auxiliando no meu crescimento como pesquisadora.

À Prof. Marion, por possibilitar minha inserção no grupo de pesquisa da Imunogenética em 2009, o qual eu gosto tanto.

Aos amigos que fizeram da Biomedicina o melhor curso que eu poderia ter escolhido: Paula, Ju (de novo), Tássia, Ana Paula, Fezis, Scheila, Laura, Anna Martha. Especial ênfase à Paula, que é a melhor amiga/irmã/parceira que a Biomed poderia ter me dado.

Aos amigos do colégio: Cla, Fran, Lini, Angelo. Agradeço por sempre estarem ao meu lado, me encorajando a novos desafios e sendo ótimos melhores amigos!

Às amigas amadas Gabi e Glícia.

Aos queridos amigos do vôlei: Álvaro, Furtado, Mi, Gabi.

Aos professores do PPGBM, por tantos ensinamentos sobre como fazer e discutir pesquisa. Um agradecimento especial à Prof. Sídia, que me fez gostar de estatística como eu nunca poderia imaginar.

Ao Elmo, por sempre ser gentil e amável!

Muito obrigada a todos vocês!

Sumário

II. Resumo	8
III. Abstract	9
1. Introdução.....	10
1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	10
1.1.1 Epidemiologia	10
1.1.2 Diagnóstico, manifestações clínicas e imunológicas	11
1.1.3 Morbidade e mortalidade	13
1.1.4 Distúrbios imunológicos	13
1.1.5 Fatores hormonais	18
1.1.6 Estresse oxidativo.....	18
1.1.7 Fatores ambientais	20
1.1.8 Evidências de susceptibilidade genética	21
1.1.9 O papel da epigenética na etiopatogênese de LES	23
1.2 Sirtuínas	26
1.2.1 SIRT1 e seus substratos	33
1.2.2 Genética de <i>SIRT1</i>	36
1.2.3 Regulação de SIRT1	39
1.2.4 SIRT1 em situações fisiopatológicas	40
1.2.5 SIRT1 e estresse oxidativo.....	42
1.2.6 O papel de SIRT1 no sistema imune e na inflamação	43
1.2.7 SIRT1 e Lúpus Eritematoso Sistêmico	48
2. Objetivos.....	49
3. Artigo	50
4. Discussão.....	70
5. Referências	76

I. Lista de Abreviaturas

ACR – *American College of Rheumatology*

Anti-dsDNA – Anticorpos anti-DNA dupla-fita

APC – Células apresentadoras de antígenos

CAT – Catalase

COX2 – Ciclooxigenase2

DCs – Células dendríticas

DM – Diabetes Mellitus

EBV – Vírus Epstein-Barr

FAN – Fator Antinuclear

FOXO – *Forkhead Box Containing Protein Type O*

GGT – γ -Glutamyltranspeptidase

GHS – Glutathione

GPx – Glutathione peroxidase

HATs – Acetilases de histonas

HDACi – Inibidor de deacetilases de histonas

HDACs – Deacetilases de histonas

HLA – Antígeno leucocitário humano

IFN – Interferon

IL – Interleucina

LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico

Linfócitos NK – Linfócitos *Natural Killer*

MDA – Malondialdeído

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

miRNA – MicroRNAs

NA – Ácido nicotínico

NAD – Cofator dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NF- κ B – *Nuclear Factor κ B*

NR – Ribosídeo de nicotinamida

PBMCs – Células mononucleares de sangue periférico

PGC-1 α – *Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ Coactivator1 α*

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PPAR- γ – *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ*
ROS – Espécies reativas de oxigênio
Sir2 – *Silent mating type Information Regulator 2*
SIRT1 – *Silent mating type Information Regulator 2 homolog 1*
SLEDAI – *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*
SOD – Superóxido dismutase
TCE – Tricloroetileno
TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR – Receptor de células T
TNF- α – Fator de necrose tumoral α
Treg – Linfócitos T regulatórios
UV – Ultravioleta

II. Resumo

Silent mating type Information Regulator 2 homolog 1 (SIRT1) é uma proteína deacetilase que participa em diversos processos fisiológicos, com importância no silenciamento transcricional, apoptose, regulação do sistema imune e inflamação. O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória autoimune com etiologia multifatorial, caracterizada pela produção de autoanticorpos, deposição de imunocomplexos e dano tecidual. Já foi demonstrado que existem níveis elevados da expressão de *SIRT1* em linfócitos T CD4+ de pacientes com LES, acompanhados de hipoacetilação global das histonas H3 e H4, com correlação entre a hipoacetilação de H3 e maior atividade da doença. Os polimorfismos rs12778366 e rs3758391 do promotor do gene *SIRT1* podem exercer influência sobre a expressão diferencial desta molécula e, no presente estudo, foi investigado o papel destas variantes na susceptibilidade ao LES. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ao comparar 367 pacientes e 290 controles quanto às frequências alélicas, genótípicas e haplotípicas dos polimorfismos rs12778366 e rs3758391 de *SIRT1*. Entretanto, o SNP rs3758391 não estava em equilíbrio de Hardy-Weingberg, apresentando um excesso de homozigotos CC e TT em ambos pacientes e controles. Após correções para múltiplas comparações, nossos resultados indicam um papel para o alelo rs3758391 T de *SIRT1* na morbidade associada ao lúpus. Pacientes com genótipos TT e CT apresentaram uma maior chance de desenvolvimento de nefrite ($P_{corr}=0,012$, OR=2,04 95% IC 1,32 – 3,14) e um maior índice de atividade da doença (Ranking médio 170,95 vs 137,26, $P_{corr}=0,006$) quando comparados a pacientes homozigotos CC. Nossos resultados sugerem que o polimorfismo rs3758391 modifica a morbidade associada ao LES, sendo o alelo rs3758391 T um fator de risco para nefrite e SLEDAI elevado. Não obstante, ainda deve ser elucidado o mecanismo funcional pelo qual a variante rs3758391 de SIRT1 influencia a severidade de LES.

III. Abstract

Silent mating type Information Regulator 2 homolog 1 (SIRT1) is a deacetylase protein that participates in several physiological processes with importance in transcriptional silencing, apoptosis, immune system regulation and inflammation. Systemic lupus erythematosus (SLE) is an inflammatory autoimmune disease with multifactorial etiology, characterized by autoantibody production, immune complex deposition and tissue damage. Upregulated expression of *SIRT1* on CD4⁺ T lymphocytes of active SLE patients was already reported and global hypoacetylation of histones H3 and H4, with H3 hypoacetylation correlated with a higher disease activity index. *SIRT1* promoter SNPs rs12778366 and rs3758391 may account for differential expression of this molecule, and in the present study, we investigated the role of these variants in SLE susceptibility. No statistically significant differences were observed comparing 367 SLE patients and 290 healthy controls concerning allelic, genotypic or haplotypic frequencies of *SIRT1* rs12778366 and rs3758391 polymorphisms. Nevertheless, *SIRT1* rs3758391 SNP was not in Hardy-Weinberg equilibrium, presenting an excess of CC and TT homozygotes in both patients and controls. After correction for multiple-comparisons, our results supported a role for *SIRT1* rs3758391 T allele in disease morbidity. SLE patients with TT and CT genotypes displayed a higher chance of developing lupus nephritis ($P_{\text{corr}}=0.012$, OR=2.04 95% CI 1.32 – 3.14) and presented a higher disease activity index (Mean rank 170.95 vs 137.26, $P_{\text{corr}}=0.006$) when compared with CC homozygotes patients. Our results suggest that SNP rs3758391 modifies SLE morbidity, with rs3758391 T allele being a risk factor for nephritis and a higher SLEDAI. Nevertheless, it remains to be elucidated how the *SIRT1* rs3758391 variation functionally influences SLE severity.

1. Introdução

1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória autoimune que envolve diversos órgãos e sistemas e é caracterizada por manifestações clínicas e imunológicas heterogêneas. Sua etiologia é desconhecida; entretanto, parece possuir origem multifatorial, onde a interação entre fatores ambientais e variantes genéticas culminam em um distúrbio, ocasionando defeitos nos mecanismos imunológicos de tolerância. Como consequência desta perda de tolerância, ocorre a produção de anticorpos contra diferentes autoantígenos, formação de imunocomplexos e depósito destes nos diferentes tecidos, causando intensa inflamação.

1.1.1 Epidemiologia

A incidência do LES varia de acordo com determinadas características da população de estudo, como idade, gênero, etnia e o período estudado. Na Europa, a incidência varia entre 2,2 casos por 100.000 pessoas por ano na Espanha e 4,8 casos por 100.000 pessoas por ano na Suécia (Alonso *et al.*, 2011; Lopez *et al.*, 2003; Stahl-Hallengren *et al.*, 2000). Nos Estados Unidos, diversos estudos estimaram a incidência anual entre 1,0 e 7,6 casos por 100.000 pessoas (Furst *et al.*, 2012; Siegel & Lee, 1973). No Brasil, foi estimada uma taxa de incidência de 4,8 casos por 100.000 habitantes/ ano no Paraná (Nakashima *et al.*, 2011), e 8,7 casos por 100.000 habitantes/ ano no Rio Grande do Norte (Vilar & Sato, 2002). Os estudos de prevalência também apresentam oscilação, o que pode ser um resultado das variações geográficas, metodologias utilizadas e aspectos socioeconômicos. Já foram determinadas taxas de prevalência de 14,6 a 103,0 casos por 100.000 habitantes nos Estados Unidos (Balluz *et al.*, 2001; Furst *et al.*, 2012; Siegel & Lee, 1973), e prevalências variando entre 12,5 – 68,0 casos em 100.000 indivíduos na Europa (Hochberg, 1987; Lerang *et al.*, 2012; Stahl-Hallengren *et al.*, 2000).

O desenvolvimento de lúpus parece ocorrer de três a quatro vezes mais em mulheres afro-americanas em comparação a mulheres caucasóides americanas (McCarty *et al.*, 1995); evidências sugerem que o LES é mais frequente em afro-americanos, índios nativos norte-americanos e em orientais, como indianos asiáticos e chineses, do que em caucasóides (Lau *et al.*, 2006).

O lúpus eritematoso sistêmico pode se manifestar em todas as idades, entretanto a maioria dos sintomas aparece entre 15 e 40 anos de idade, com média entre 29 e 32 anos (Cervera *et al.*, 1993). Em relação ao gênero, a doença se desenvolve muito mais comumente em mulheres do que em homens, com uma proporção em torno de 9 mulheres para 1 homem. A forte predominância de mulheres em idade reprodutiva possivelmente indica a participação de fatores hormonais na etiologia multifatorial desta doença.

1.1.2 Diagnóstico, manifestações clínicas e imunológicas

Sendo o LES uma doença multifatorial, ela é caracterizada por uma grande variabilidade em relação às manifestações clínicas, alterações morfológicas e evolução da doença. Consequentemente, o seu diagnóstico é de difícil estabelecimento. Este foi estabelecido pela *American College of Rheumatology (ACR)*, onde pelo menos quatro entre onze critérios devem ser satisfeitos para um paciente ser diagnosticado como portador de lúpus eritematoso sistêmico (Hochberg, 1997). Abaixo, encontram-se os critérios e suas descrições:

1. Erupção malar: Eritema sobre a região malar;
2. Erupção discóide: Placas eritematosas elevadas com descamação ceratótica aderente e rolhas córneas foliculares, onde cicatrizes atróficas podem ocorrer;
3. Fotossensibilidade: Erupção cutânea resultante da exposição a raios ultravioleta (UV);
4. Úlceras orais: Úlceração oral ou nasofaríngea, geralmente sem dor;
5. Artrite: Artrite não-erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizada por sensibilidade, inchaço ou derrame;
6. Serosite: Pleurite (histórico convincente de dor pleurítica ou atrito auscultado por médico, ou evidências de derrame pleural) ou pericardite (documentado por eletrocardiograma ou atrito, ou por evidência de derrame pericárdico);
7. Doença renal: Proteinúria persistente ($> 0,5\text{g/dL}$ ou classificação +++ em exame) e/ou presença de cilindros celulares no exame microscópico de urina;
8. Doença neurológica: Convulsões ou psicose (na ausência de drogas agressoras ou disfunções conhecidas do metabolismo, como uremia, cetoacidose, desequilíbrio eletrolítico);

9. Doença Hematológica: Anemia hemolítica (com reticulose), leucopenia (contagem menor que 4000 leucócitos totais/ μL em duas ou mais ocasiões) ou linfopenia (contagem menor que 1500 linfócitos/ μL em duas ou mais ocasiões) ou trombocitopenia (contagem de plaquetas menor que $100 \times 10^3/\mu\text{L}$ na ausência de drogas agressoras);

10. Doença imunológica: Anticorpos anti-DNA dupla-fita (Anti-dsDNA), anti-Sm e/ou antifosfolípido. Os autoanticorpos mais comumente descritos em LES são anticorpos anti-dsDNA e anti-Sm. O primeiro tem afinidade por determinantes de ácido nucléico conservados, que são encontrados no DNA, enquanto o segundo reage com ribonucleoproteínas nucleares pequenas (snRNP), que consistem em moléculas de snRNA ligadas a proteínas.

11. Fator antinuclear (FAN): Titulações anormais de anticorpos antinucleares por imunofluorescência ou ensaio equivalente, a qualquer momento e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas com a síndrome lúpus induzida por droga. O teste de FAN é realizado quando existe suspeita de lúpus pelos sintomas clínicos (como na presença de dois ou três sintomas), e é geralmente usado como teste confirmatório, entretanto não pode ser usado independentemente da análise clínica, visto que aproximadamente 5% da população apresenta esses anticorpos em baixos títulos.

O curso da doença é caracterizado por períodos de remissão e exacerbação, onde diferentes desfechos podem ocorrer, desde remissão total até óbito. Estudos descritivos sobre a epidemiologia de LES demonstraram que dentre as manifestações clínicas mais frequentes entre os pacientes estão a erupção malar (31,1 - 76,6%), nefropatia (27,9 - 74%), artrite (48,1 - 88,1%), fotossensibilidade (22,9 - 60,2%) e úlceras orais (12,5 - 52,8%) (Alarcon *et al.*, 2002; Cervera *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1997). Dentre os marcadores sorológicos mais prevalentes estão os anticorpos antinucleares (96%), anti-DNA (78%), anti-Ro (25%), IgG anticardiolipina (24%) e anti-LA (19%) (Cervera *et al.*, 1993).

A atividade de lúpus eritematoso sistêmico é medida a partir do índice SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*), onde 24 sinais clínicos e testes laboratoriais recebem um determinado peso de acordo com sua importância/ gravidade na atividade da doença (Bombardier *et al.*, 1992). Os pesos variam entre 8, como no caso de convulsão, psicose e vasculite, e 1, incluindo trombocitopenia, leucopenia e febre. A soma

destes sintomas resulta no escore final da doença para o determinado paciente, no qual uma maior pontuação indica um maior índice de atividade da doença.

1.1.3 Morbidade e mortalidade

Houve grande melhora nos índices de morbidade e mortalidade associados ao lúpus eritematoso sistêmico nos últimos anos devido ao tratamento com fármacos imunossuppressores e intensos cuidados médicos. As morbidades mais sérias que acometem os pacientes são lesões de órgãos, aterosclerose acelerada e risco aumentado para alguns tipos de câncer (Bernatsky *et al.*, 2005). Alguns estudos já demonstraram que existe uma mortalidade elevada em pacientes com LES, de quatro a cinco vezes maior que na população geral (Jimenez *et al.*, 2003). A maior taxa de mortalidade em lúpus pode ser atribuída à atividade da doença (onde ocorre dano a órgãos e/ ou sistemas), às complicações no tratamento ou às sequelas de longo prazo (Bernatsky *et al.*, 2006). O estudo de coorte Euro-Lupus avaliou as causas mais comuns de mortalidade entre os pacientes, apresentando os seguintes resultados: LES ativo (21,7 - 28,9%), infecções (17,4 - 28,9%), sepse bacteriana (17,4 - 24,4%), trombose (26,1 - 26,7%), cerebral (11,1 - 13%), e causas desconhecidas (15,6 - 30,4%) (Cervera *et al.*, 1993).

1.1.4 Distúrbios imunológicos

O LES manifesta-se como uma doença de caráter sistêmico, caracterizada por reações autoimunes contra antígenos próprios. Uma das características mais marcantes dos pacientes é a produção de autoanticorpos. O FAN está presente em mais de 95% dos pacientes. Ainda não é conhecido o mecanismo pelo qual estes anticorpos antinucleares entram em contato com os antígenos nucleares. Tais anticorpos não são capazes de penetrar nas células em condições fisiológicas. Conseqüentemente, é provável que o reconhecimento de antígenos nucleares ocorra através da liberação destes por células lesadas ou apoptóticas. Uma elevação nos níveis de apoptose em conjunto com uma remoção deficiente das células apoptóticas - ambos eventos evidenciados em LES - têm como consequência um aumento nos títulos de autoanticorpos (Emlen *et al.*, 1994; Herrmann *et al.*, 2000; Perniok *et al.*, 1998). Além do FAN, também é possível a formação de outros tipos de autoanticorpos, como anticorpos direcionados contra eritrócitos, plaquetas, linfócitos, fatores de coagulação e fosfolipídios. A identificação dos tipos de

autoanticorpos possui importância para a caracterização da doença, visto que alguns tipos destes já foram correlacionados com a presença de certos aspectos de morbidade associados ao lúpus. Uma alta titulação de anticorpos anti-dsDNA tem sido considerada um bom marcador de atividade da doença e está associada à glomerulonefrite ativa (Bootsma *et al.*, 1995). Estes anticorpos podem se ligar a moléculas de DNA presentes na membrana glomerular através de antígenos como histonas, nucleossomos e laminina (van Bruggen *et al.*, 1997). A vasculopatia oclusiva - que constitui um achado comum entre os pacientes - é associada com a presença de anticorpos antifosfolipídios (Love & Santoro, 1990).

Os autoanticorpos são os mediadores definitivos da lesão tecidual observada em LES. Eles entram em contato com autoantígenos, formando imunocomplexos que se associam com componentes do sistema complemento, resultando em intensa inflamação dos diferentes tecidos. Diversas citocinas estão envolvidas na desregulação do sistema imune e em processos de inflamação local, também participando da lesão de tecidos e órgãos. As primeiras manifestações de pacientes com a doença são decorrentes da inflamação, como vasculite e vasculopatia, que podem ser evidenciadas principalmente através de lesões na pele, rins, articulações e membranas serosas. O dano tecidual ocorre como consequência da crônica reação autoimune descontrolada.

A figura abaixo (Figura 1) indica componentes que participam da inflamação em LES.

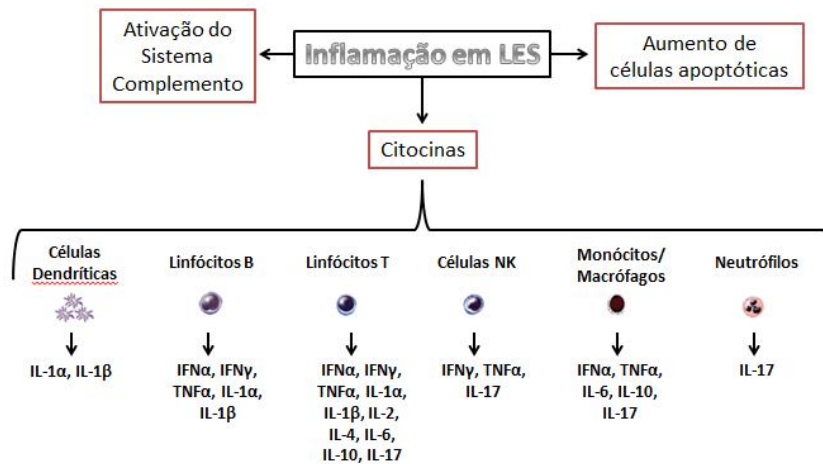


Figura 1. Componentes envolvidos na inflamação evidenciada em LES. Adaptada de (Lopez-Pedraza *et al.*, 2010).

Os autoanticorpos são produzidos por linfócitos B autorreativos. Dentre as anormalidades encontradas nos linfócitos B dos pacientes, estão a linfopenia, atividade aumentada e autorreatividade desta subpopulação. A autorreatividade é evidenciada através dos vários autoanticorpos que podem ser formados e este processo origina-se no começo da ontogenia da célula B, onde *checkpoints* comuns de tolerância durante o desenvolvimento celular são violados (Yurasov *et al.*, 2005). Existe uma redução no número de células B virgens e um aumento de plasmócitos secretores de imunoglobulinas na periferia, sendo que os últimos se correlacionam com a atividade da doença (Jacobi *et al.*, 2003; Odendahl *et al.*, 2000).

Em lúpus, os linfócitos T estão hiperativados, resultando na estimulação excessiva dos linfócitos B. Diversas rotas bioquímicas e níveis de expressão gênica estão alterados. A ativação celular dos linfócitos T através das moléculas receptor de células T (TCR) e CD3 leva a uma resposta de sinalização celular mais precoce e mais forte nos pacientes, que está relacionada a um aumento da expressão da molécula coestimulatória CD40L (Li *et al.*, 2007). Outro fator que influencia a maior ativação dos linfócitos T em LES é uma maior agregação de *rafts* lipídicos, que são domínios de membrana ricos em moléculas de sinalização celular e que se polarizam durante a ativação celular (Li *et al.*, 2007).

Os linfócitos T auxiliares (Th; CD4+) dos pacientes com lúpus possuem um perfil aberrante da produção de citocinas e, portanto, uma capacidade efetora comprometida. Existe uma diminuição na expressão de IL-2 nestes linfócitos, que pode ser responsável pela menor atividade citotóxica, função alterada de linfócitos T regulatórios (Treg) e morte celular induzida por redução de ativação (Crispin *et al.*, 2008a; Lieberman & Tsokos, 2010).

Também existem altos níveis das interleucinas IL-17A e IL-17F no soro dos pacientes (Doreau *et al.*, 2009), que são produzidas por uma alta porcentagem de células CD4+ e linfócitos duplo-negativos (CD4-, CD8-) (Crispin *et al.*, 2008b). A IL-17 amplifica a resposta inflamatória através do recrutamento de células efetoras para os órgãos; ela contribui para a formação de centros germinativos, aumenta a sobrevivência e proliferação de linfócitos B e a transformação destes em plasmócitos secretores de imunoglobulinas. A produção exacerbada de IL-17 está correlacionada com maiores índices de atividade de LES (Doreau *et al.*, 2009).

A diferenciação de células T em células Th17 produtoras de IL-17 ocorre na presença de certas citocinas inflamatórias, como IL-6, IL-21 e TGF- β (Korn *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008), e já foi evidenciado que existe um aumento da expressão de IL-6 e IL-21 em pacientes com LES (Linker-Israeli *et al.*, 1991; Wong *et al.*, 2010). A interleucina IL-6 estimula a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos secretores de imunoglobulinas, assim como também induz a produção de IgG (Muraguchi *et al.*, 1988), e evidencia-se que estes altos níveis estão associados à hiperatividade das células B e produção de anticorpos (Tackey *et al.*, 2004). A IL-6 estimula também a maturação e ativação de macrófagos e neutrófilos (Sachs *et al.*, 1989). A interleucina IL-21 é produzida por células T CD4+ diferenciadas e linfócitos Natural Killer (NK) e age nos receptores IL-21R expressos em linfócitos T CD4+, CD8+, linfócitos B, células NK, células dendríticas (DCs) e macrófagos (Spolski & Leonard, 2008), onde possui diferentes funções, como induzir a diferenciação de células T virgens em linfócitos Th17, estimular a proliferação de linfócitos T CD8+ (Leonard *et al.*, 2008), e inibir a maturação de DCs (Brandt *et al.*, 2003).

A citocina IL-10 também parece ter um papel na patologia do lúpus: esta citocina de perfil Th2 estimula a expansão e a diferenciação de células B. A produção basal de IL-10 parece ser mais alta em LES que em controles, e pacientes LES possuem concentrações séricas de IL-10 mais altas que controles, o que correlaciona com a atividade da doença (Grondal *et al.*, 2000; Llorente *et al.*, 1993).

Os linfócitos Treg também estão em menor quantidade e são funcionalmente anormais em pacientes com lúpus (Crispin *et al.*, 2004), enquanto os linfócitos T citotóxicos (Tc; CD8+) possuem capacidade citotóxica reduzida (Stohl, 1995). O número de linfócitos duplo-negativos é elevado, e estes linfócitos induzem a produção de anticorpos anti-DNA pelas células B autorreativas e secretam IL-1 β e IL-17 (Crispin *et al.*, 2008b).

As células dendríticas e monócitos em pacientes com LES possuem fenótipo e função excessivamente estimulados. A presença de IFN- α , de moléculas coestimulatórias de linfócitos Th, como CD40L, e de nucleossomos livres no soro de pacientes causa a diferenciação e ativação de DCs e estimula a produção de grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias por estas células, como IFN- α e IL-6, resultando em uma amplificação da resposta imune (Blanco *et al.*, 2001; Decker *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2006). Os maiores produtores de IFN são as células dendríticas plasmocitóides (Fitzgerald-Bocarsly *et al.*,

2008). Elas liberam esta citocina em resposta à ativação das moléculas *Toll-like Receptors* e de imunocomplexos (Lovgren *et al.*, 2004). Pacientes com LES possuem níveis séricos aumentados de IFN- α (Ytterberg & Schnitzer, 1982), que se correlacionam positivamente com a atividade da doença (Bengtsson *et al.*, 2000), visto que esta molécula estimula a atividade citotóxica de linfócitos T CD8+ (Blanco *et al.*, 2005). Existe uma maior expressão de genes regulados por IFN em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de pacientes com LES, o que é conhecido como “assinatura de interferon” (Baechler *et al.*, 2003; Obermoser & Pascual, 2011).

Em condições fisiológicas, os processos de fagocitose e degradação de células apoptóticas pelos macrófagos ocorrem eficiente e rapidamente, de forma que antígenos nucleares não ativem especificamente células do sistema imune. Entretanto, outra característica da doença é a habilidade reduzida de macrófagos engolfar as células apoptóticas (Herrmann *et al.*, 1998). Estas células apoptóticas não fagocitadas entram em necrose secundária (Herrmann *et al.*, 1998). Complexos formados por nucleossomos e a proteína que os estabiliza, HMGB1, são liberados das células necróticas. Estes complexos podem ser evidenciados no sangue dos pacientes, onde induzem tanto a secreção de citocinas de macrófagos quanto a ativação de DCs (Urbonaviciute *et al.*, 2008; Urbonaviciute *et al.*, 2007). Em indivíduos saudáveis, o sistema imune reconhece células apoptóticas como um sinal anti-inflamatório, de maneira que DCs não são ativadas e não apresentam antígenos apoptóticos de uma forma que possibilitaria a ativação de possíveis linfócitos T autorreativos. Entretanto, este mecanismo não ocorre corretamente em LES, onde o material apoptótico nem sempre é reconhecido como anti-inflamatório e contribui para a ativação das DCs (Crispin *et al.*, 2010).

Alterações no sistema complemento também estão presentes na patologia de lúpus. Este sistema está relacionado com opsonização, ligação e ativação de células do sistema imune e eliminação de imunocomplexos. A remoção dos imunocomplexos depositados em órgãos, mediada por fagócitos, parece ser anormal em pacientes com LES (Nagata *et al.*, 2010). Além disso, existe um número reduzido e defeitos funcionais de receptores para complemento CR1 e alguns receptores de IgG parecem ter capacidade reduzida de se ligar às imunoglobulinas presentes nos imunocomplexos, contribuindo para uma remoção ineficiente destes complexos (Dijstelbloem *et al.*, 2000; Kiss *et al.*, 1996).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que é uma proteína envolvida na rota de apoptose, possui seus níveis elevados em soro de pacientes com LES e estes níveis se correlacionam com a atividade da doença, da mesma forma que seus receptores TNF-R I e II também estão elevados nos pacientes (Aringer *et al.*, 2002; Studnicka-Benke *et al.*, 1996). As moléculas de TNF- α estão biologicamente ativas em LES e, ao cultivar linfócitos com TNF- α por 24h, existe uma maior proporção de células apoptóticas em pacientes em relação a controles (Aringer *et al.*, 2002).

1.1.5 Fatores hormonais

Como mencionado anteriormente, a maior incidência de LES em mulheres parece ser um indicativo do envolvimento de fatores hormonais. Menarca precoce, uso de contraceptivos e terapia de reposição hormonal pós-menopausa foram associados com um aumento do desenvolvimento de LES (Costenbader *et al.*, 2007). Surto da doença são mais comuns durante a segunda metade do ciclo menstrual em mulheres, quando há um aumento dos níveis de estrogênio (Bruce & Laskin, 1997). Já foi identificado um metabolismo anômalo de estrógenos em pacientes de ambos os sexos, com um aumento de 16 α hidroxiestrona (Lahita *et al.*, 1979), que representa um forte hormônio feminilizante, assim como concentrações mais baixas de hormônios masculinos, como a testosterona (Jungers *et al.*, 1982; Mok & Lau, 2000). Influências destes hormônios têm sido descritas na função imune, por exemplo, o estrogênio aumenta a diferenciação de células B e sua produção de anticorpos, e andrógenos parecem diminuir a produção de anticorpos, aumentar a resposta Th1 e inibir a Th2 (Sthoeger *et al.*, 1988; Suzuki *et al.*, 1995). Tal efeito antagônico dos hormônios sexuais combinado com o aumento de estrogênio e redução de androgênios parece explicar algumas manifestações da doença.

1.1.6 Estresse oxidativo

Diversas alterações nos sistemas de defesa ao estresse oxidativo já foram encontradas em pacientes com LES. O estresse oxidativo pode estar influenciando na patogênese de LES por contribuir para a disfunção das células do sistema imunológico, para a produção de autoantígenos e a reatividade de autoanticorpos.

Uma forma pela qual se pode evidenciar alterações nos sistemas de defesa antioxidante é através da indicação de níveis elevados do marcador de peroxidação lipídica

malondialdeído (MDA), níveis reduzidos da molécula antioxidante glutathiona (GSH) e atividade reduzida das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) em soro de pacientes com lúpus (Hassan *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2011b; Taysi *et al.*, 2002). Estes resultados contribuem para o reconhecimento de que existe um desequilíbrio entre espécies oxidativas e a defesa antioxidante em LES. Também foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis de MDA e o índice de atividade da doença SLEDAI, indicando que a peroxidação lipídica evidenciada em LES está envolvida no aumento de dano tecidual (Shah *et al.*, 2011b; Tewthanom *et al.*, 2008).

Além de níveis séricos alterados de moléculas envolvidas com estresse oxidativo, também foi encontrada uma redução da capacidade *redox* em linfócitos T, através de menores níveis de GSH, GPx e γ -Glutamyl-Transpeptidase (GGT), e em neutrófilos polimorfonucleares, com menores níveis de GSH e GGT (Li *et al.*, 2012). A severidade da doença também parece ser reforçada pelo desequilíbrio entre estresse oxidativo e citocinas derivadas de linfócitos Th1 em LES, o que é indicado pela correlação negativa entre as moléculas IFN- γ e IL-12 com GSH em LES e correlações positivas fortes entre IFN- γ e MDA com o índice SLEDAI (Shah *et al.*).

Outro estudo demonstrou que a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares está associada à apoptose total de linfócitos T e à apoptose específica de linfócitos T CD4⁺ em LES. Os níveis de peroxidação lipídica foram correlacionados positivamente com apoptose em células T CD4⁺ e os níveis de glutathiona reduzida foram correlacionados negativamente com a apoptose total de linfócitos T e apoptose específica de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em LES, enquanto estas correlações não foram evidenciadas em controles saudáveis (Shah *et al.*, 2011a).

A produção excessiva de ROS perturba o status *redox* celular, podendo causar dano a macromoléculas (peroxidação de lipídeos da membrana plasmática, proteínas, DNA, entre outras). A alteração de proteínas mediada por ROS as torna altamente imunogênicas, resultando na formação de neoepitopos que subsequentemente são alvos para a formação de autoanticorpos (Kurien & Scofield, 2008). A perturbação do status *redox* celular também influi na modulação da expressão de moléculas inflamatórias e do sistema imune, com consequente exacerbação da inflamação e dano tecidual (Al Arfaj *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2011b).

1.1.7 Fatores ambientais

Apesar de diversos fatores hormonais, imunológicos e genéticos já terem sido descritos na susceptibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico, fatores ambientais parecem desempenhar um papel importante para estimular o desencadeamento desta autoimunidade. Agentes infecciosos podem provocar lesão tecidual e liberar componentes intracelulares, provocando uma reação imunológica contra autoantígenos, assim como podem ativar células B autorreativas ou induzir resposta imune através de mimetismo molecular. Teoricamente, tais mecanismos poderiam iniciar um surto de lúpus ou contribuir para sua patogênese. A evidência mais forte na relação entre infecções e LES é o caso do vírus Epstein-Barr (EBV) (James *et al.*, 2001). Anticorpos direcionados ao EBV possuem reação cruzada com os antígenos Sm e Ro de 60kDa (McClain *et al.*, 2005).

Determinadas dietas também parecem estar relacionadas com a doença, como dietas com alto teor de gorduras saturadas, nas quais estes lipídios poderiam interferir na quantidade de mediadores inflamatórios sintetizados. A dieta afeta a produção de autoanticorpos, a secreção de citocinas, a produção de mediadores inflamatórios e subsequentemente altera a expectativa de vida em modelos murinos para lúpus; a restrição calórica impede o declínio de linfócitos T CD8⁺ e reduz os altos níveis de IL-12 e IFN- γ , diminui os níveis de NF- κ B e a produção de IgA e IgG2 em camundongos NZB/W (Jolly *et al.*, 2001; Muthukumar *et al.*, 2000). Estudos com camundongos propensos a desenvolver lúpus NZB/NZW indicam que o desenvolvimento da doença é desacelerado quando a dieta contém ômega-3, em relação a dietas com gorduras saturadas, além de estes animais possuírem menores níveis de anticorpos anti-dsDNA (Alexander *et al.*, 1987). Uma deficiência de ácidos graxos essenciais na dieta é benéfica para camundongos NZB/W por reduzir os níveis de ácido aracônico, molécula precursora para a formação de prostaglandinas e leucotrienos, ambos envolvidos no processo inflamatório (Harbige, 2003).

Alguns compostos químicos também estão associados ao LES. Os compostos químicos hidralazina, presente no cigarro e em agrotóxicos, procainamida e isoniazida podem induzir uma síndrome semelhante a lúpus (*lupus-like syndrome*) (Vedove *et al.*, 2009). A exposição a estas drogas induz, direta ou indiretamente, mudanças nos padrões de metilação do DNA e de modificações de histonas. Alta exposição ocupacional à sílica também está associada ao lúpus (Parks *et al.*, 2002). Também existem evidências para

associação entre exposição ao solvente industrial tricloroetileno (TCE) e LES (Cooper *et al.*, 2009). Inclusive, a exposição ao TCE leva à formação de anticorpos antinucleares em camundongos (Griffin *et al.*, 2000).

Exposição à luz solar e aos raios UV, em especial UVB, também desencadeiam e exacerbam sintomas de LES. Um provável mecanismo para tal indução pode envolver alterações químicas no DNA, aumento da imunogenicidade de antígenos como nRNP e indução de apoptose em queratinócitos (Casciola-Rosen & Rosen, 1997; Furukawa *et al.*, 1990).

1.1.8 Evidências de susceptibilidade genética

O lúpus eritematoso sistêmico possui etiologia multifatorial, onde a combinação de fatores genéticos, hormonais e imunológicos predispõe um indivíduo, e a interação destes fatores com estímulos ambientais resulta no desencadeamento da autoimunidade. O desenvolvimento de LES possui uma contribuição genética forte, com uma herdabilidade estimada acima de 66%, concordância entre gêmeos monozigóticos de 24-56% e entre gêmeos dizigóticos de 2-5% (Alarcon-Segovia *et al.*, 2005; Deapen *et al.*, 1992). Diversos estudos de associação e ligação encontraram múltiplos *loci* que conferem susceptibilidade genética para lúpus (Rhodes & Vyse, 2008). Muitos destes *loci* contém polimorfismos que estão em genes que codificam proteínas funcionalmente relevantes para a patogênese desta doença, como os genes do complexo principal de histocompatibilidade, moléculas de sinalização celular de citocinas, apoptose e do sistema complemento.

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) compreende um grupo de genes altamente polimórficos que codificam moléculas de superfície celular que possuem, como função primária, a capacidade de ligar fragmentos peptídicos e expô-los na superfície celular, para que possam ser reconhecidos pelos TCRs de linfócitos T auxiliares ou citotóxicos. Em humanos, o MHC é referido como o complexo antígeno leucocitário humano (HLA), e os genes presentes neste complexo estão organizados em regiões que codificam três classes de moléculas: os MHC de classe I, II e III. A região do MHC, que possui a maior densidade gênica do genoma humano e possui muitos genes que codificam moléculas do sistema imune (Goldberg *et al.*, 1976), já foi apontada como significativamente ligada a LES em estudos de ligação (Wakeland *et al.*, 2001). Muitos estudos demonstram associação entre susceptibilidade a LES e alguns alelos do HLA de classe II (HLA-DR, DQ e DP), como DR2 (DRB1*1501 e DRB1*1503), assim como forte

associação entre alelos DR2 e DR3 com as manifestações imunológicas anticorpos anti-SSA e anti-SSB, enquanto DR4 e DR7 são associados com anticorpos anticardiolipina (Tsao, 2002).

O antígeno leucocitário humano G (HLA-G) é uma molécula HLA não-clássica que desempenha funções imunossupressoras através da sua interação com diversos tipos de receptores encontrados em células do sistema imune (Borges & Cosman, 2000; Goodridge *et al.*, 2007). O alelo +3142G, localizado na região 3'UTR do gene *HLA-G*, está associado a susceptibilidade a LES (Consiglio *et al.*, 2011).

Anormalidades envolvendo a genética do sistema complemento parecem sustentar a hipótese do possível papel deste sistema na susceptibilidade a LES, principalmente com moléculas da via clássica de ativação do complemento. A deficiência completa de C2 ou C4 é associada a um alto risco de desenvolvimento da doença (Walport, 2001), e a deficiência completa de C1q está associada a um risco de 98% de desenvolvimento do LES (Stone *et al.*, 2000). Funcionalmente, uma anormalidade em C1q pode estar associada a um acúmulo de células apoptóticas, em consequência da remoção deficiente destas por fagócitos.

Alguns outros exemplos de alelos ou variantes polimórficas que conferem susceptibilidade a lúpus são a variante -308A da região promotora do gene *TNF* (Pan *et al.*, 2012), o alelo T do polimorfismo rs7574865 do gene que codifica a proteína de sinalização STAT4 (Remmers *et al.*, 2007), e o SNP rs2476601 (Arg620Trp) do gene *PTPN22* (Gregersen & Olsson, 2009), o qual codifica uma fosfatase envolvida na inibição da ativação de linfócitos T (Cohen *et al.*, 1999).

A Figura 2 esquematiza fatores imunológicos envolvidos na etiopatogênese de LES.

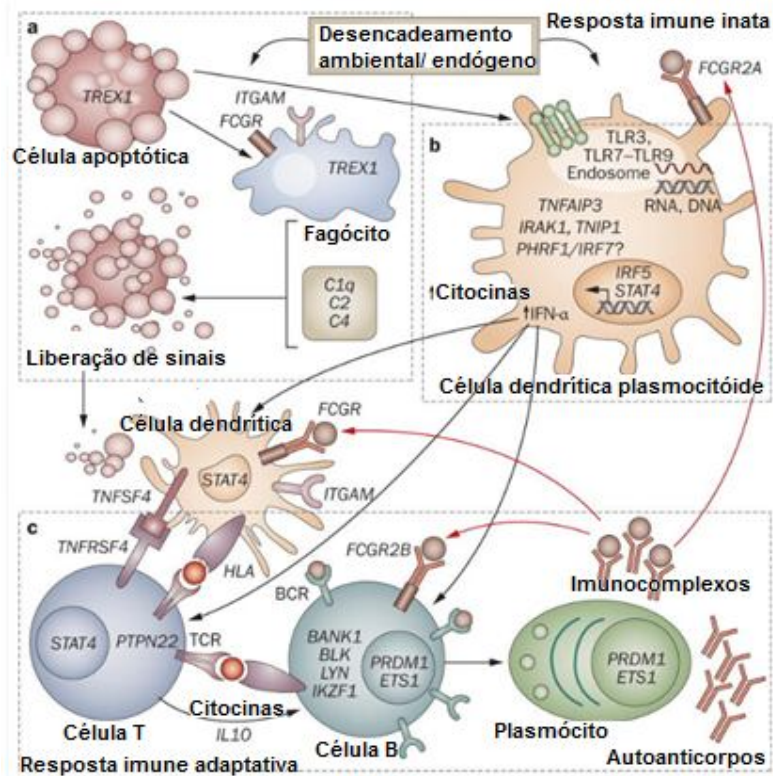


Figura 2. Fatores imunológicos envolvidos no desenvolvimento de LES. Adaptado de (Deng & Tsao, 2010).

Portanto, a etiopatogênese desta doença multifatorial provavelmente envolve diversos processos, onde a interação entre a perda de tolerância a antígenos nucleares, deficiências no sistema complemento, ativação anormal do sistema imune com produção de autoanticorpos, anormalidades no processo de apoptose, expressão de antígenos nucleares através de moléculas HLA susceptíveis, exposição a fatores ambientais específicos, entre outros processos descritos acima, participam para o desenvolvimento de LES.

1.1.9 O papel da epigenética na etiopatogênese de LES

Mecanismos de regulação epigenética têm recebido atenção especial na patogênese de diversas doenças complexas, entre elas as patologias autoimunes. A epigenética estuda mudanças estáveis, reversíveis e passíveis de serem herdadas no DNA, que influenciam a expressão gênica e não dependem da sequência de DNA. Estas mudanças são responsáveis por regular a expressão gênica, definindo transcriptomas e fenótipos celulares, e possuindo um importante papel no ciclo celular e no desenvolvimento.

A regulação epigenética é essencial para o desenvolvimento normal e para a manutenção do sistema imune, e uma alteração nestes processos pode influenciar o balanço entre um sistema imune saudável e o desenvolvimento de autoimunidade. O lúpus é uma doença que envolve tanto uma predisposição genética, quanto fatores ambientais para seu desencadeamento. As modificações epigenéticas presentes no genoma humano são susceptíveis a fatores ambientais. Desta forma, a epigenética constitui uma ligação direta entre ambiente e genética, visto que mudanças ambientais podem acarretar mudanças epigenéticas e, desta maneira, alterações no perfil de expressão gênica.

O epigenoma compreende o conjunto de modificações químicas epigenéticas presentes no DNA e em proteínas histonas de um tipo celular. Cada tipo celular possui seu respectivo epigenoma, e estes podem diferir substancialmente entre os diferentes tecidos, sendo que muitos estudos tem caracterizado perfis epigenéticos de diferentes situações fisiológicas e patológicas para os diversos tecidos. Um dos tipos principais de alterações epigenéticas é caracterizado por modificações pós-traducionais de histonas.

Cada subtipo de histona pode ser modificado quimicamente por alterações pós-traducionais, incluindo a acetilação, metilação, ubiquitinação, fosforilação, sumoilação, entre outros. A modificação epigenética de acetilação de histonas neutraliza os resíduos carregados positivamente das histonas, reduzindo a afinidade das caudas destas proteínas pelo DNA, que é carregado negativamente. Desta forma, o resultado é uma estrutura da cromatina mais aberta e acessível a fatores de transcrição, de forma que esta modificação é associada à atividade transcricional. As lisinas localizadas nas caudas das histonas são passíveis de receber modificações covalentes pela ligação de grupos acetil. Este processo de acetilação é altamente regulado, e é catalisado pelas enzimas acetiltransferases de histonas (HAT), que adicionam os grupamentos acetil nos resíduos de histonas, enquanto as deacetilases de histonas (HDACs) removem estes grupamentos. A família das HDACs compreende um grupo de enzimas, que foram subdivididas em 5 classes, indicadas na tabela 1.

Tabela 1. Classes de HDACs.

	Membros	Cofator	Localização celular
Classe I	HDAC-1, -2, -3 e -8	Zinco	Núcleo
Classe IIA	HDAC-4, -5, -7 e -9	Zinco	Núcleo/ citoplasma
Classe IIB	HDAC-6 e -10	Zinco	Citoplasma
Classe III	Sirtuínas 1-7	NAD+	Núcleo/ citoplasma
Classe IV	HDAC-11	Zinco	Núcleo/ citoplasma

Estudos envolvendo gêmeos monozigóticos demonstraram que as diferenças no padrão de modificações epigenéticas aumentam com a idade (Fraga *et al.*, 2005), e que gêmeos que possuíam um maior grau de diferença eram aqueles discordantes para o desenvolvimento de uma dada doença ou aqueles que apresentavam pouco compartilhamento de ambiente (havia sido separados mais precocemente). Desta forma, a análise de gêmeos monozigóticos discordantes para LES tem revelado novas vias e fatores que podem estar envolvidos na regulação epigenética nesta doença (Ballestar, 2011). Entretanto, atualmente não existem evidências suficientes para alegar que mudanças epigenéticas sejam a causa ou a consequência da doença, ou seja, é difícil dizer se os fatores ambientais causaram as modificações epigenéticas que resultaram em LES, ou se estes fatores resultaram na patogênese desta autoimunidade através de outro mecanismo desconhecido, que foi acompanhado por modificações epigenéticas.

Alguns estudos verificaram que as modificações de histonas de pacientes com LES estão alteradas. Linfócitos T CD4+ de pacientes apresentam hipoacetilação global das histonas H3 e H4 quando comparados com controles, e a hipoacetilação de H3 se correlaciona com a atividade da doença (Hu *et al.*, 2008). Os linfócitos T de pacientes com lúpus possuem uma superexpressão de IL-10 e CD154 e o tratamento destas células com o inibidor de HDACs tricostatina A (TSA), aumenta-se o nível global de acetilação, revertendo o perfil anterior (Mishra *et al.*, 2001). Além de reverter a hipoacetilação global, a administração de TSA também melhora a doença renal e o curso da doença em camundongos *lupus-prone* MRL/lpr (Garcia *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2003; Reilly *et al.*, 2004). Apesar da hipoacetilação global, existe também uma hiperacetilação específica das histonas H4 em genes que estão envolvidos com ativação celular, proliferação celular e imunidade antiviral em macrófagos (Zhang *et al.*, 2010d). Também já foi verificado que existe expressão reduzida de HDACs em linfócitos T CD4+ de LES (Hu *et al.*, 2008).

Em um estudo feito por Dieker e colaboradores (Dieker *et al.*, 2007), observou-se que autoanticorpos KM-2 de camundongos de modelo de lúpus MRL/lpr reconhecem modificações induzidas por apoptose em nucleossomos, mais especificamente as marcas de acetilação nas lisinas 8, 12 e 16 (K8, K12 e K16) da histona 4 (H4). A maior parte destes camundongos e dos pacientes com lúpus estudados apresentou maior reatividade com o peptídeo H4 acetilado nas respectivas lisinas, com histonas hiperacetiladas e histonas apoptóticas do que peptídeos H4 não acetilados e histonas normais, indicando que a acetilação de K8, K12 e K16 parece ser importante para LES. A administração de ambas histonas H4 acetiladas e não acetiladas separadamente em camundongos normais MRL/++ e BALB/c não resultou em reatividade com anticorpos anti-dsDNA, enquanto a administração de H4 acetilado em camundongos MRL/lpr acelerou o tempo: do desenvolvimento da doença, de proteinúria e de lesões na pele. Também foi evidenciado que nucleossomos hiperacetilados induzem a maturação de células dendríticas, com produção de IL-6 e TNF- α e, na presença destes nucleossomos triacetilados nas lisinas K8, K12 e K16, estas células estimulam a resposta T, com produção de IL-2. A triacetilação evidenciada pode ser consequência da atividade elevada de HATs e da atividade reduzida de HDACs. Entretanto, ao tratar camundongos *lupus-prone* com inibidores de HDACs, não ocorre um aumento na liberação de histonas hiperacetiladas de células apoptóticas na circulação sanguínea e é possível, inclusive, que este tratamento induza efeitos anti-inflamatórios. Em outro estudo, foi demonstrado que o anticorpo derivado de lúpus LG11-2 de camundongos preferencialmente reage com a histona H2B acetilada no resíduo de lisina 12, que é acetilada no início do processo apoptótico (van Bavel *et al.*, 2009).

Recentemente, tem sido evidenciado que inibidores de deacetilases de histonas (HDACi) podem ter um efeito benéfico em doenças autoimunes por alterarem o padrão de acetilação de histonas aberrante encontrado nestas doenças. O uso destes inibidores acarreta uma hiperacetilação das proteínas histonas, influenciando a expressão gênica, e possuindo atividade anti-inflamatória seletiva e moduladora da função imune. Alguns destes inibidores, como a TSA, são atualmente utilizados para tratar tumores.

1.2 Sirtuínas

As sirtuínas são um grupo de enzimas que pertencem à classe III de deacetilases de histonas. Uma importante característica que distingue bioquimicamente este grupo das

demais HDACs é a utilização do cofator dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado (NAD⁺) para catalisar a reação de deacetilação. O cofator NAD⁺ é um metabólito intracelular que é formado a partir de precursores exógenos como o ácido nicotínico (NA) e o ribosídeo de nicotinamida (NR), que estão presentes na vitamina B3 e no leite respectivamente, e também sintetizado pela via *de novo* de biossíntese a partir do aminoácido triptofano (Figura 3).

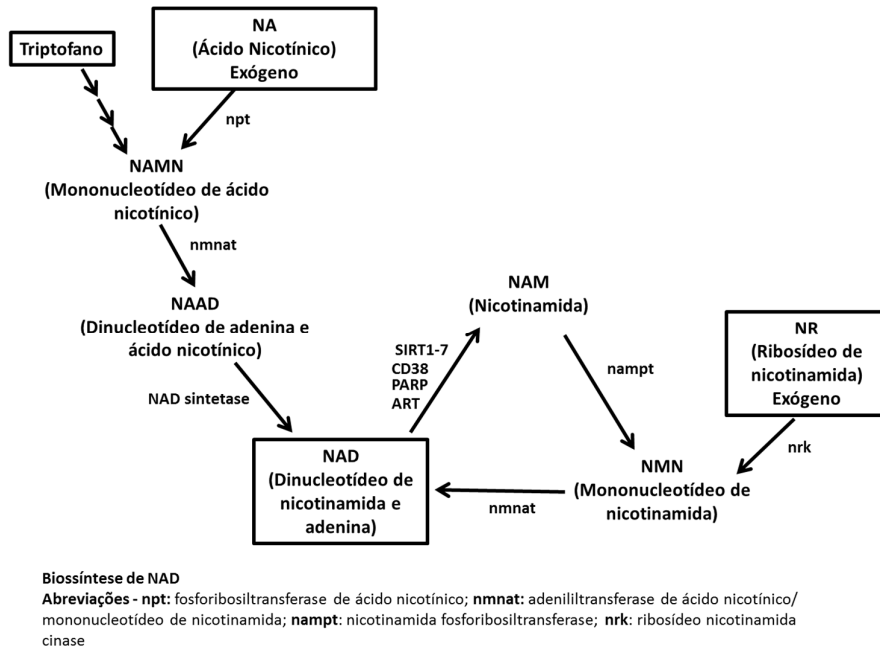


Figura 3. Rota de biossíntese de NAD. Adaptado de (Sauve *et al.*, 2006).

A coenzima NAD possui duas formas: uma forma oxidada, NAD⁺, e uma reduzida, NADH. Ambas são importantes para o metabolismo celular, pois participam de diversas reações químicas de oxirredução no metabolismo celular onde os elétrons liberados pelas moléculas que sofrem oxidação se ligam a NAD⁺, formando NADH. Portanto, NAD é uma coenzima essencial para carrear elétrons durante diversas etapas do metabolismo.

Como a atividade das sirtuínas depende da disponibilidade de NAD⁺, esta proteína atua como um sensor do status *redox* celular, fazendo uma ponte entre as condições energéticas intracelulares, que dependem do estado nutricional da célula, e a deacetilação de diversos substratos (Figura 4).

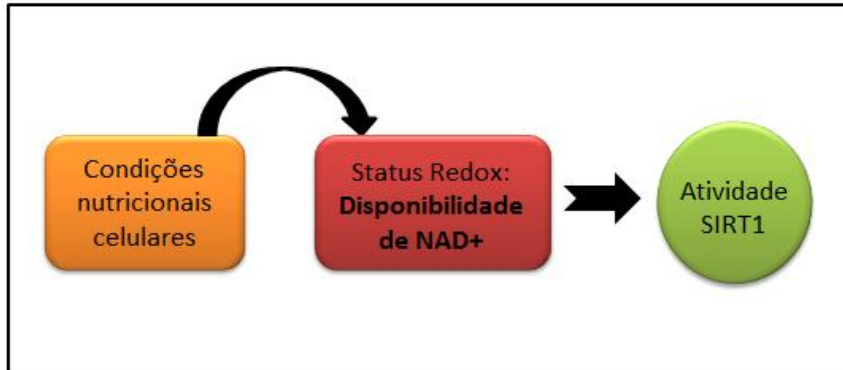


Figura 4. Relação entre a atividade de SIRT1 e o metabolismo.

Sabe-se que os níveis de NAD⁺ celulares são elevados nas condições de jejum, restrição calórica e exercício físico (Canto *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2008), levando a uma ativação de SIRT1, enquanto uma dieta rica em gorduras diminui a razão NAD⁺/NADH (Kim *et al.*, 2011). Como as sirtuínas não são as únicas enzimas NAD⁺ dependentes, a disponibilidade de NAD⁺ celular também é alterada pela utilização deste cofator por outras enzimas, como PARP1 e CD38.

As sirtuínas deacetilam substratos através de uma reação, onde ocorre a hidrólise de NAD⁺ a ADP-ribose e nicotinamida, a transferência do grupo acetil de uma proteína à ADP-ribose, tendo como resultado 2'-O-acetil-ADP-ribose e uma proteína deacetilada (Figura 5).

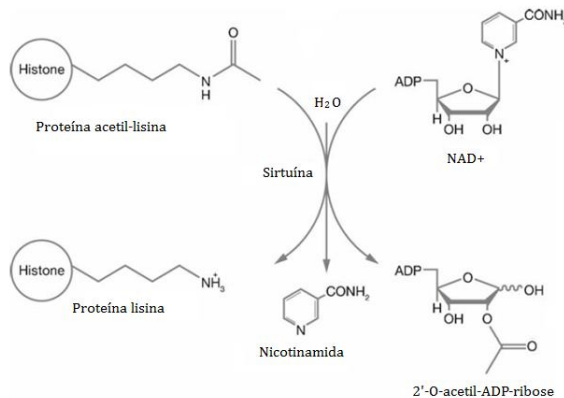


Figura 5. Reação de deacetilação por uma sirtuína. Adaptado de (Sauve *et al.*, 2006).

As sirtuínas compreendem uma família de enzimas que é conservada evolutivamente e pode ser identificada em arqueobactérias, eubactérias e eucariotos. O primeiro membro identificado desta família foi o *Silent mating type Information Regulator 2* (Sir2) em

Saccharomyces cerevisiae. Posteriormente, este foi encontrado em outros organismos como *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e muitos outros.

Hoje, sabe-se que genomas bacterianos e a maioria dos genomas de arqueobactérias possuem apenas um gene para sirtuínas, enquanto eucariotos possuem múltiplas sirtuínas. Em mamíferos, o primeiro gene codificando uma sirtuína encontrado foi o *Silent mating type Information Regulator 2 homolog 1 (SIRT1)*, que é considerado o homólogo de sequência de *Sir2*. Existem outras seis sirtuínas identificadas em mamíferos, totalizando sete diferentes genes codificadores para estas proteínas: *SIRT1-SIRT7*. Em seres humanos, estas sirtuínas estão diferencialmente distribuídas nas células, variam quanto sua especificidade tecidual, atividade enzimática e substratos alvo. As sirtuínas SIRT 1, 2, 6 e 7 são encontradas no núcleo, sendo as SIRT1, 2 também encontradas no citoplasma, e as SIRT3, 4, 5 nas mitocôndrias (Michishita *et al.*, 2005), ver Figura 6.

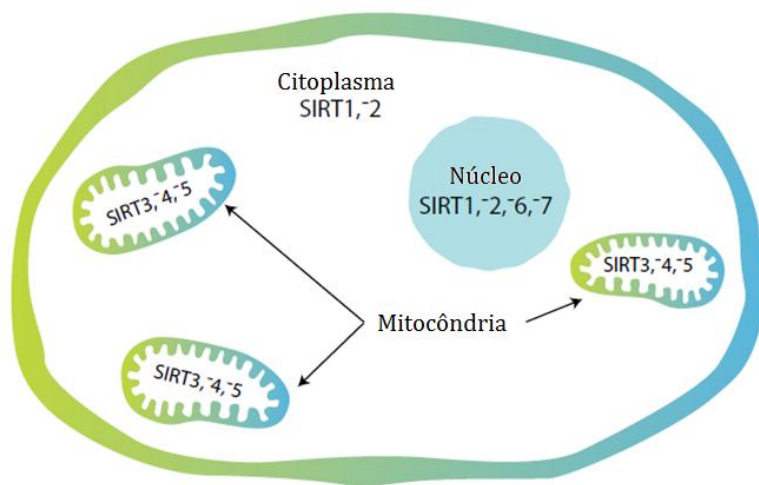


Figura 6. Localização intracelular das sirtuínas humanas. Adaptado de (Kelly, 2010).

As enzimas SIRT1-SIRT7 também possuem uma expressão variada nos tecidos e órgãos. A tabela 2 indica onde as sirtuínas são expressas.

Tabela 2. Expressão das sirtuínas humanas.

Enzima	Células/ Tecidos/ Órgãos	Referência
SIRT1	Algumas regiões do cérebro, como hipotálamo; coração; timo; rins; fígado; pâncreas; músculo esquelético; baço; tecido adiposo branco; granulócitos, monócitos, células T.	(Hu <i>et al.</i> , 2008; Michishita <i>et al.</i> , 2005; Shan <i>et al.</i> , 2009; Song <i>et al.</i> , 2011b)
SIRT2	Adipócitos de tecido adiposo branco e pardo; sistema nervoso.	(Harting & Knoll, 2010; Jing <i>et al.</i> , 2007; Michishita <i>et al.</i> , 2005)
SIRT3	Músculo esquelético; tecido adiposo branco e pardo; coração; rins; fígado e outros tecidos com altas taxas metabólicas.	(Hokari <i>et al.</i> , 2010; Huang <i>et al.</i> , 2010; Michishita <i>et al.</i> , 2005; Sundaresan <i>et al.</i> , 2008)
SIRT4	Em vários tecidos com altas taxas metabólicas, como as ilhotas pancreáticas de Langerhans.	(Ahuja <i>et al.</i> , 2007; Huang <i>et al.</i> , 2010; Michishita <i>et al.</i> , 2005)
SIRT5	Vários tecidos, incluindo o fígado.	(Huang <i>et al.</i> , 2010; Michishita <i>et al.</i> , 2005; Ogura <i>et al.</i> , 2010)
SIRT6	Expressa amplamente, principalmente no tecido adiposo, músculo esquelético, cérebro e coração.	(Kanfi <i>et al.</i> , 2010; Koltai <i>et al.</i> , 2010; Liszt <i>et al.</i> , 2005)
SIRT7	Vários tecidos, como no tecido adiposo, fígado, baço, coração.	(Ford <i>et al.</i> , 2006)

As propriedades estruturais conhecidas das sirtuínas foram descritas em organismos filogeneticamente pouco complexos, como leveduras, bactérias e arqueobactérias, sendo que a estrutura das sirtuínas humanas ainda não foi determinada. Em cada proteína sirtuína existe um núcleo catalítico conservado, que apresenta aproximadamente 250 aminoácidos. Cada sirtuína possui dois domínios característicos. O maior domínio possui a estrutura da dobra de Rossmann, que é encontrada em proteínas que ligam NAD⁺/NADH ou NADP⁺/NADPH. O menor domínio é composto por resíduos de duas inserções da dobra

de Rossmann, uma que contém quatro cisteínas que coordenam um átomo de zinco e outro módulo helical que forma uma alça flexível. A distância relativa entre os domínios varia entre as diferentes sirtuínas. Tanto a proteína substrato a ser deacetilada quanto o cofator NAD⁺ se ligam em uma fenda entre os dois domínios anteriormente mencionados (Sauve *et al.*, 2006). Na Figura 7, pode-se visualizar a estrutura da sirtuína, onde a Dobra de Rossmann está em amarelo, o módulo de ligação ao zinco em azul claro e o módulo helical em azul; o peptídeo acetilado (em vermelho) e o cofator NAD⁺ (em verde) ligam na fenda entre os domínios maior e menor.

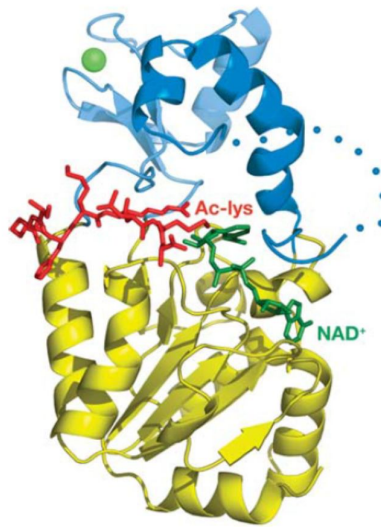


Figura 7. Estrutura de uma sirtuína. Retirado de (Sauve *et al.*, 2006).

As sirtuínas ligam seus peptídeos substrato para deacetilação através de interações β -folha entre átomos do peptídeo e átomos dos domínios maior e menor. Este tipo de interação ordena a orientação N- para C-terminal do esqueleto do peptídeo. A lisina acetilada do substrato fica inserida em um túnel hidrofóbico da fenda, que possui um resíduo de histidina conservado necessário para a atividade catalítica de deacetilase. A molécula NAD⁺ se liga à sirtuína de forma adjacente ao peptídeo substrato, entre os dois domínios da proteína (Sauve *et al.*, 2006).

As sirtuínas humanas apresentam diferenças quanto à sua composição de aminoácidos, comprimento de extensões N- e C-terminal e do núcleo catalítico enzimático. A esquematização abaixo (Figura 8) indica cada sirtuína humana, sendo que as regiões em

azul indicam o núcleo enzimático conservado entre elas. O número total de aminoácidos é indicado acima de cada SIRT - adaptado de (Carafa *et al.*, 2012).

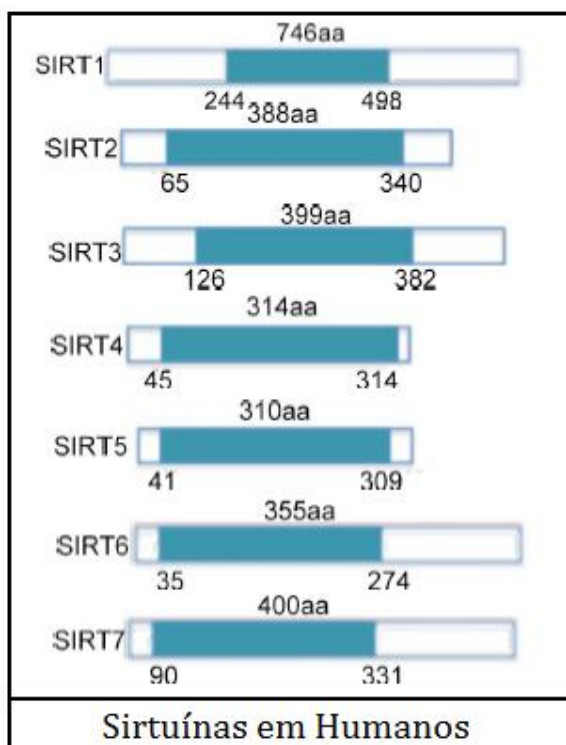


Figura 8. Comparação entre as sirtuínas humanas. Adaptado de (Carafa *et al.*, 2012).

Esta diversidade de proteínas sirtuínas, sua localização subcelular diferencial e expressão tecidual e as variações quantitativas e qualitativas de aminoácidos indicam que estas moléculas têm papéis biológicos distintos entre si. De fato, esta família de proteínas possui outra atividade catalítica além de deacetilase. Algumas sirtuínas, como SIRT 4 e 6, possuem atividade catalítica de ADP-ribosil transferase, onde ocorre a transferência do grupo ADP-ribose do NAD⁺ para proteínas aceptoras no processo de modificação pós-traducional chamado ADP-ribosilação. A SIRT5 possui, além da deacetilação, a atividade de retirar resíduos malonil (demalonilação) e resíduos succinil (desuccinilação) de substratos. A tabela 3 classifica as sirtuínas humanas quanto ao seu tipo de atividade catalítica.

Tabela 3. Atividade catalítica das sirtuínas humanas. Adaptado de (Houtkooper *et al.*, 2012).

Sirtuína	Atividade
SIRT1	Deacetilação
SIRT2	Deacetilação
SIRT3	Deacetilação
SIRT4	ADP-ribosilação
SIRT5	Deacetilação, Demalonilação, Desuccinilação
SIRT6	Deacetilação e ADP-ribosilação
SIRT7	Deacetilação

Visto as diferenças existentes entre as distintas sirtuínas humanas, parece lógico que elas estejam relacionadas com processos celulares e fisiológicos distintos. Sabe-se que a SIRT2 possui um papel no controle do ciclo celular, deacetilando a proteína do citoesqueleto tubulina; a SIRT3 – que possui localização mitocondrial – está envolvida na produção de ATP, na regulação da deacetilação de proteínas mitocondriais e oxidação de ácidos graxos. A sirtuína SIRT4 está envolvida na secreção de insulina; SIRT5 deacetila o Citocromo C; SIRT6 se associa a telômeros e atua na sua manutenção, no reparo de DNA e na estabilidade genômica enquanto a sirtuína SIRT7 está envolvida na transcrição pela RNA polimerase I (Carafa *et al.*, 2012).

1.2.1 SIRT1 e seus substratos

A mais estudada sirtuína humana é a SIRT1, homóloga de Sir2 de leveduras. Esta proteína possui diferentes funções nas células. Uma delas é mediar a formação de heterocromatina através da deacetilação de histonas. SIRT1 pode deacetilar as histonas H1, H2, H3 e H4, mas preferencialmente deacetila a lisina 26 da histona H1 (H1K26), as lisinas 9, 14 e 56 da histona H3 (H3K9, H3K14 e H3K56) e a lisina 16 da histona H4 (H4K16) (Vaquero *et al.*, 2004; Vaquero *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2009). O processo de deacetilação de histonas pode facilitar a metilação de histonas e, portanto, elevar a repressão transcricional global. SIRT1 promove a trimetilação de H3K9 através da interação com a metiltransferase de histonas Suv39H1 (Bosch-Presegue & Vaquero, 2011; Liu *et al.*, 2009). Além das histonas, a sirtuína SIRT1 também é capaz de deacetilar outras proteínas, controlando suas atividades e tendo efeitos em diversas condições fisiológicas. Estas proteínas substrato incluem fatores de transcrição, proteínas envolvidas no reparo de

DNA e fatores de sinalização celular. Dentre algumas destas moléculas estão as proteínas FOXO (FOXO1, FOXO3), PPAR- γ , PGC-1 α , p53, NF- κ B, Ku7.

O PGC-1 α (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ Coactivator1 α*) é um coativador transcricional capaz de ativar fatores de transcrição como PPAR γ , PPAR α , ERR α e FOXO1 e, desta forma, regular genes envolvidos com o controle transcricional de proteínas mitocondriais tendo impacto na biogênese e função mitocondrial (Feige & Auwerx, 2007; Finley & Haigis, 2009; Rodgers *et al.*, 2008). Em condições de baixos níveis de nutrientes como jejum e restrição calórica, a atividade de SIRT1 aumenta e esta deacetila e ativa PGC-1 α , causando uma mudança na expressão gênica mitocondrial. No fígado, há uma mudança metabólica da via glicolítica para a via de gliconeogênese, acarretando um aumento de glicose hepática (Rodgers *et al.*, 2005; Rodgers & Puigserver, 2007) e um aumento da oxidação de ácidos graxos para utilização destes como fonte de energia (Gerhart-Hines *et al.*, 2007).

PPAR- γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ*) é um fator que regula a transcrição de genes envolvidos na regulação do metabolismo de ácidos graxos. SIRT1 deacetila PPAR- γ , alterando a expressão de genes relacionados com o metabolismo a favor de lipólise e da mobilização de ácidos graxos para uso de energia (Picard *et al.*, 2004).

SIRT1 também deacetila o fator de transcrição FOXO1 (*Forkhead Box Containing Protein Type O 1*), que está envolvido com o metabolismo energético do corpo. Durante as situações de restrição calórica e jejum, SIRT1 deacetila e ativa FOXO1, que ativa a transcrição dos seus genes alvo a favor de gliconeogênese (Frescas *et al.*, 2005). No pâncreas, a deacetilação de FOXO1 pela SIRT1 tem como consequência a transcrição de genes que ativam a secreção de insulina (Olbrot *et al.*, 2002), assim como em adipócitos ocorre um aumento de sensibilidade a insulina decorrente da transcrição de adiponectina dependente de FOXO1 deacetilado por SIRT1 (Banks *et al.*, 2008; Qiao & Shao, 2006).

O fator de transcrição FOXO3, que controla diversas funções biológicas como detoxificação de espécies reativas de oxigênio, parada de ciclo celular, reparo de DNA e apoptose, também é deacetilado pela sirtuína SIRT1. Em resposta ao estresse oxidativo, SIRT1 deacetila FOXO3, reforçando a expressão de genes de parada do ciclo celular e reparo de DNA e atenuando a apoptose FOXO3-dependente (Brunet *et al.*, 2004).

NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*) é um importante fator envolvido na regulação da inflamação e é um mediador das respostas imunológicas. NF- κ B pode ser deacetilado na

sua subunidade p65 pela sirtuína SIRT1 (Yeung *et al.*, 2004). A acetilação deste fator aumenta a duração e a eficiência da sua resposta transcricional (Chen & Greene, 2003) e, portanto, a sua deacetilação causa a inibição da atividade transcricional. Neste contexto, ocorre a redução da expressão de genes que medeiam sobrevivência celular e, como consequência, as células ficam sensíveis à apoptose induzida por pelo fator TNF- α (Yeung *et al.*, 2004), ver Figura 9.

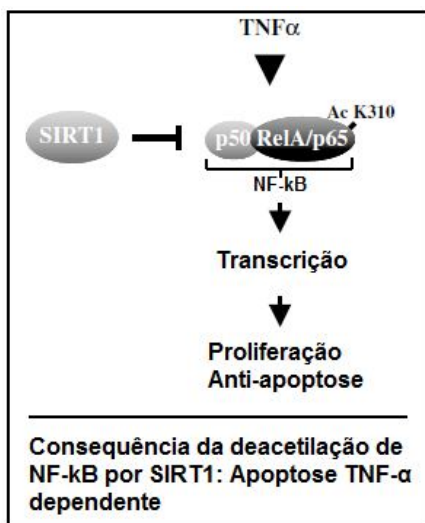


Figura 9. Deacetilação de NF- κ B por SIRT1. Adaptado de (Yeung *et al.*, 2004).

Outros estudos indicam que a deacetilação do NF- κ B induz uma proteção das ilhotas β pancreáticas contra toxicidade de citocinas, aumentando a viabilidade destas ilhotas e preservando a secreção de insulina (Lee *et al.*, 2009). Adicionalmente, a deacetilação desse fator de transcrição está envolvida na redução da expressão de genes pró-inflamatórios nos adipócitos, resultando em uma melhor sinalização de insulina (Yoshizaki *et al.*, 2009).

Um importante substrato para deacetilação pela sirtuína SIRT1 é o supressor tumoral p53 (Langley *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2004; Vaziri *et al.*, 2001). Esta proteína possui um papel fundamental no controle do ciclo celular e apoptose, e sua ativação ocorre em resposta a diferentes tipos de estresse, como oncogênese e genotoxicidade. A acetilação de p53 é essencial para a ativação transcricional de seus genes alvo (Tang *et al.*, 2008). A deacetilação de p53 pode facilitar a sua ubiquitinação e consequente degradação proteossomal, assim como enfraquecer sua habilidade de ligação ao DNA (Luo *et al.*, 2004), reduzindo os níveis de apoptose e de parada do ciclo celular.

SIRT1 também deacetila o fator de reparo de DNA e inibidor de apoptose Ku70. Quando deacetilado, Ku70 forma um complexo com a proteína pró-apoptótica Bax, sequestrando-a e prevenindo a apoptose mediada por Bax (Cohen *et al.*, 2004).

Existem também outros substratos para SIRT1, como LXR α , LXR β , STAT3, E2F1, eNOS, p73, revisados em (van Leeuwen & Lain, 2009; Yu & Auwerx, 2010). Novos alvos de deacetilação por esta proteína estão continuamente sendo descobertos (Finkel *et al.*, 2009).

Portanto, a habilidade de SIRT1 de promover o remodelamento da cromatina e de interagir e deacetilar um amplo espectro de fatores de transcrição e proteínas sugere que esta sirtuína possui uma importante participação na manutenção da homeostase, resposta ao estresse, sinalização endócrina e metabolismo celular (McGuinness *et al.*, 2011).

1.2.2 Genética de *SIRT1*

O gene *SIRT1* é um gene de cópia única que possui 33.660 pb e está localizado na região 21.3 do braço longo do cromossomo 10 (10q21.3), sendo composto por nove éxons e oito íntrons (Figura 10).

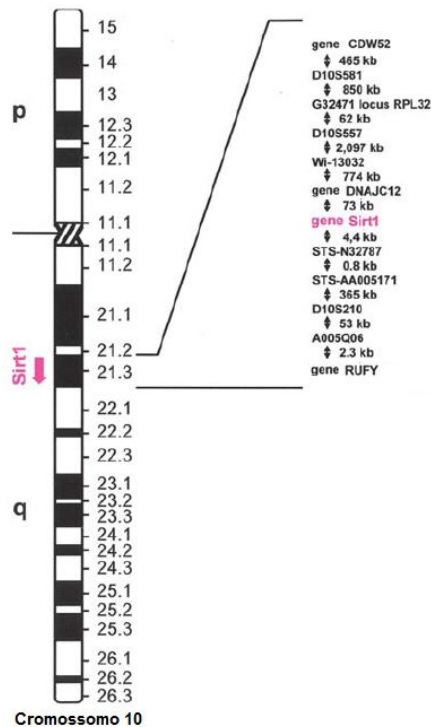


Figura 10. Localização cromossômica de *SIRT1*. Adaptado de (Voelter-Mahlknecht & Mahlkecht, 2006).

O tamanho dos éxons varia entre 80 e 2.120 pb e dos íntrons entre 1.108 e 15.234 pb. Os íntrons 1, 3, 4 e 8 possuem elementos nucleares intercalados curtos (SINEs), como repetições *Alu*, e longos (LINEs). A região que codifica o domínio catalítico conservado no gene *SIRT1* está entre os éxons 3 e 8, e os aminoácidos 244 a 498 da proteína SIRT1 (Voelter-Mahlknecht & Mahlknecht, 2006). Existe uma região 3' não traduzida (3'UTR) que possui 1.782 bases do stop códon ao sinal consenso para poliadenilação (Voelter-Mahlknecht & Mahlknecht, 2006), ver Figura 11.

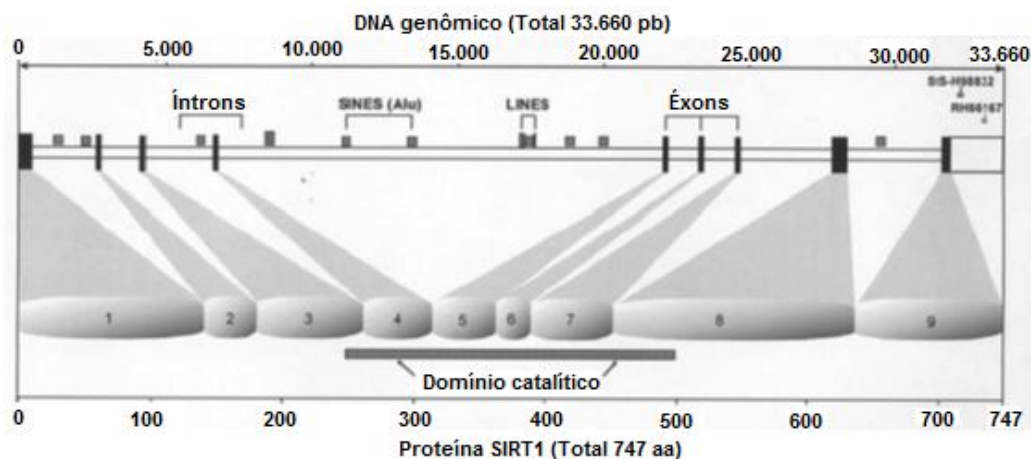


Figura 11. Gene *SIRT1*. Adaptado de (Voelter-Mahlknecht & Mahlknecht, 2006).

O mRNA de *SIRT1* pode apresentar duas isoformas: a isoforma (a) e a isoforma (b). A isoforma (a) é transcrita a partir dos 9 éxons e quando encadeada possui 4.107 bases, das quais 2.244 bases produzirão a proteína de 747 aminoácidos. A isoforma b de *SIRT1* é transcrita a partir de 8 éxons e possui 3.587 bases, das quais 1.359 bases darão origem a 452 aminoácidos.

Ao longo da região promotora e do gene de *SIRT1*, diversos polimorfismos foram descritos. Muitos destes foram pesquisados em estudos de associação a fim da possível identificação de alelos que conferem susceptibilidade genética a diversos desfechos, como diabetes, síndrome metabólica, longevidade, obesidade, esquizofrenia, doença de Parkinson.

O polimorfismo rs3758391, que está localizado na posição -1085 da região promotora de *SIRT1*, compreende uma transição entre uma citosina (C) e uma timina (T). Um estudo visando encontrar evidências de susceptibilidade genética a longevidade

demonstrou que o alelo rs3758391 C está associado ao envelhecimento (OR=1,453, P=0,026), assim como o genótipo CC (OR=3,041, P=0,027) (Zhang *et al.*, 2010c). Contudo, um estudo de 2007 com idosos acima de 85 anos indicou que indivíduos com o alelo rs3758391 T obtiveram melhores scores em testes de capacidade cognitiva (Kuningas *et al.*, 2007) e outro grupo de pesquisadores não encontrou qualquer associação com o polimorfismo rs3758391 e fenótipo de longevidade (Flachsbart *et al.*, 2006). Outro grupo de pesquisadores observou que o alelo rs3758391 T predispõe a Diabetes Mellitus tipo 2 (OR=1,32, P=0,031) (Cruz *et al.*, 2010). O grupo de Naqvi e colaboradores identificou que o polimorfismo rs3758391 está em um sítio de ligação a p53 na região promotora de *SIRT1* e que este SNP afeta a transcrição desta sirtuína nas condições de privação de nutrientes e de restrição calórica (Naqvi *et al.*, 2011). O alelo C possui menor capacidade de ligação a p53 quando comparado ao alelo T, resultando em uma menor sensibilidade do promotor a nutrientes e capacidade prejudicada de induzir a expressão de *SIRT1* em restrição calórica.

O polimorfismo rs12778366 está localizado na posição -1348 da região promotora de *SIRT1* e é um SNP C/T. Maeda e colaboradores investigaram o papel deste polimorfismo no desenvolvimento de nefropatia diabética; entretanto, não foi encontrada qualquer associação (Maeda *et al.*, 2010). Nenhuma associação foi observada para este SNP e depressão maior (Kishi *et al.*), transtorno bipolar e esquizofrenia (Kishi *et al.*, 2011a) e psicose induzida por metanfetamina (Kishi *et al.*, 2011b). O polimorfismo rs12778366 também não apresentou associação com maior gasto de energia corporal entre filhos não diabéticos de pacientes com DM2 (Lagouge *et al.*, 2006). O estudo TULIP, que envolveu uma intervenção controlada no modo de vida de seus participantes, encontrou uma associação entre um SNP no íntron 4 de *SIRT1* (rs12413112 A) com gordura hepática, sensibilidade a insulina e baixa responsividade à glicose sérica (Weyrich *et al.*, 2008); este estudo especula que possivelmente este polimorfismo esteja influenciando negativamente a expressão de *SIRT1* através do seu alto desequilíbrio de ligação com SNPs do promotor deste gene, como o polimorfismo rs12778366.

Próximo a estes dois SNPs, existem alguns polimorfismos com baixa frequência alélica que ainda não foram avaliados em estudos de associação, como os polimorfismos rs10740280 (-1759), rs143094735 (-1476), rs71971907 (-1442), rs146157701 (-1289), rs140114858 (-1213) e rs142146381 (-1142). A Figura 12 apresenta um esquema dos principais polimorfismos descritos para a região promotora de *SIRT1*.

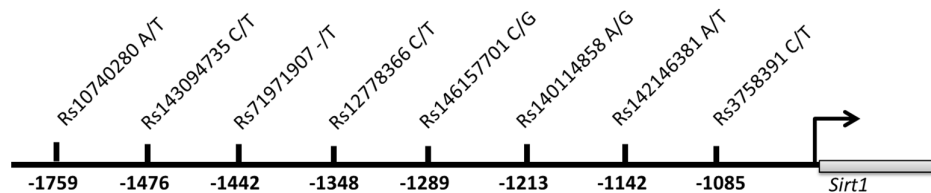


Figura 12. Polimorfismos da região promotora de *SIRT1*.

1.2.3 Regulação de SIRT1

Além da disponibilidade de NAD⁺, existem outros fatores que regulam a expressão e atividade de SIRT1. A expressão de SIRT1 pode ser induzida pela ligação de certos fatores de transcrição ao seu promotor, como FOXO1 (Nemoto *et al.*, 2004), p53 (Naqvi *et al.*, 2011), CREB (Noriega *et al.*, 2011), PPAR α (Hayashida *et al.*, 2010) e PPAR δ (Okazaki *et al.*, 2010), enquanto a ligação de outros fatores diminui a sua expressão, como nos casos de CHREBP (Noriega *et al.*, 2011), PPAR γ (Han *et al.*, 2010), HIC1 (Chen *et al.*, 2005), p53 (Nemoto *et al.*, 2004) e PARP2 (Bai *et al.*, 2011).

MicroRNAs (miRNAs), pequenos RNAs de 20 a 24nt, desempenham um importante papel na supressão da expressão gênica através da sua ligação com sítios aceptores presentes em RNA mensageiros, onde agem bloqueando sua tradução e/ ou direcionando-os para a degradação. Os miRNAs miR-34a e miR-199a estão envolvidos com a repressão de SIRT1 (Rane *et al.*, 2009; Yamakuchi *et al.*, 2008).

Na região N-terminal de SIRT1 existem duas sequências de localização nuclear e duas sequências de exportação nuclear que são responsáveis pelo tráfego nuclear-citoplasmático desta proteína e, desta forma, também influem na sua habilidade de interagir com substratos destes compartimentos (Hisahara *et al.*, 2008; Tanno *et al.*, 2007).

Modificações pós-traducionais também podem regular a atividade de SIRT1. Já foram identificados 13 sítios de fosforilação protéica (Sasaki *et al.*, 2008) e algumas cinases que fosforilam esta sirtuína, como ciclina B-CDK, JNK e DYRKs 1 e 3 (Guo *et al.*, 2010; Nasrin *et al.*, 2009; Sasaki *et al.*, 2008). A fosforilação por estas diferentes enzimas permite diferentes desfechos, como proliferação celular, deacetilação de H3 e sobrevivência celular respectivamente. mTOR também pode fosforilar SIRT1, resultando na inibição da sua atividade (Back *et al.*, 2011). SIRT1 também pode sofrer SUMOilação,

resultando em um aumento de sua atividade (Yang *et al.*, 2007c). Ver a Figura 13 para um esquema sobre as modificações pós-traducionais que podem ocorrer em SIRT1.

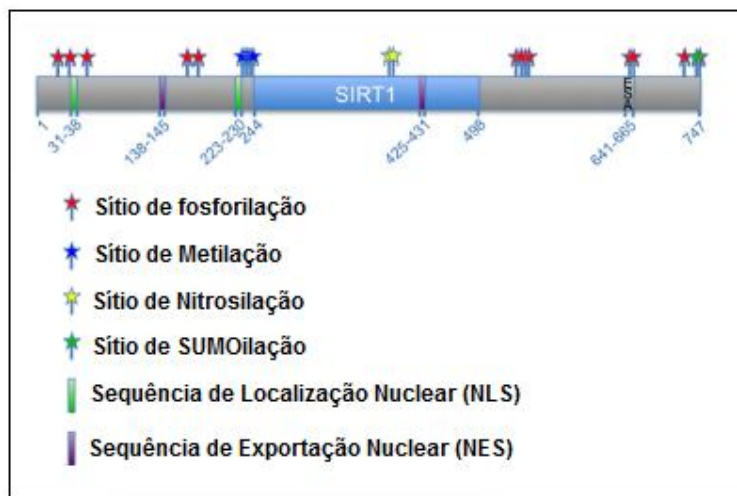


Figura 13. Modificações pós-traducionais de SIRT1. Adaptado de (Flick & Luscher, 2012).

Alguns compostos possuem a propriedade de regular a atividade das sirtuínas. Um destes compostos é o polifenol presente em uvas chamado resveratrol. Este polifenol altera a estrutura de SIRT1, reforça sua atividade em até oito vezes e facilita a sua ligação com o substrato acetilado (Borra *et al.*, 2005; Howitz *et al.*, 2003). Contudo, existem resultados controversos quanto à ativação de SIRT1 por resveratrol ser direta ou indireta e se seus efeitos benéficos sobre o organismo são ocasionados realmente pela ativação de SIRT1 (Baur *et al.*, 2006; Borra *et al.*, 2005; Kaerberlein *et al.*, 1999; Kahyo *et al.*, 2008; Lagouge *et al.*, 2006; Pacholec *et al.*, 2010).

Existem inibidores não específicos de sirtuínas, como nicotinamida, suramina e dihidrocoumarina (Avalos *et al.*, 2005; Olaharski *et al.*, 2005; Schuetz *et al.*, 2007). Dentre outros inibidores estão sirtinol, derivados de sirtinol como salermida, derivados de splitomicina e tenovinas (Heltweg *et al.*, 2006; Lain *et al.*, 2008; Lara *et al.*, 2009; Ota *et al.*, 2007).

1.2.4 SIRT1 em situações fisiopatológicas

A expressão e a atividade da sirtuína SIRT1 são muito susceptíveis a mudanças no ambiente como dieta e modo de vida. Estudos iniciais em *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* e *C. elegans* demonstraram que Sir2 está envolvida em diversas vias metabólicas, incluindo

vias importantes para o envelhecimento e longevidade. Uma forma pela qual Sir2 influencia estas vias importantes é através da restrição calórica. Adicionalmente, muitos estudos tem focado a atenção na importância das sirtuínas em processos fisiológicos e patológicos como obesidade, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), câncer e doenças neurodegenerativas. Brevemente, a tabela 4 indica os efeitos de SIRT1 em algumas situações.

Tabela 4. Efeitos de SIRT1 em situações fisiopatológicas.

Situação	Efeito de SIRT1:	Referência
Restrição Calórica	Restrição aguda de nutrientes eleva os níveis de SIRT1 em modelo de células de mamíferos;	(Nemoto <i>et al.</i> , 2004)
Longevidade	Deleção de <i>SIRT1</i> reduz a longevidade de leveduras; Doses extras de <i>SIRT1</i> aumentam a longevidade de <i>C. elegans</i> ; A maior expressão de SIRT1 aumenta a longevidade em camundongos;	(Kaeberlein <i>et al.</i> , 1999; Rogina & Helfand, 2004; Tissenbaum & Guarente, 2001)
Envelhecimento Cognitivo	SIRT1 é necessária para manutenção da plasticidade sináptica, aprendizagem e memória e, portanto, para a cognição; SIRT1 reduz a produção de placas β amiloides em Alzheimer; No modelo da doença de Huntington, a expressão de SIRT1 é altamente reduzida;	(Bordone <i>et al.</i> , 2007; Michan <i>et al.</i> , 2010; Pallas <i>et al.</i> , 2008; Song <i>et al.</i> , 2011a)
Câncer	SIRT1 é superexpressa em alguns cânceres, como câncer de próstata, leucemia mielóide aguda e câncer de pele; SIRT1 possui uma baixa expressão em outros tipos de câncer, como glioblastoma, carcinoma de próstata e câncer de bexiga;	(Bradbury <i>et al.</i> , 2005; Hida <i>et al.</i> , 2007; Huffman <i>et al.</i> , 2007; Wang <i>et al.</i> , 2008)
Metabolismo	No modelo de DM2, existe uma redução da expressão de SIRT1 no início desta patologia; Existe uma menor expressão do mRNA de SIRT1 em	(Costa Cdos <i>et al.</i> , 2010; Fadini <i>et al.</i> , 2011;

	<p>leucócitos de pacientes de DM2;</p> <p>Há uma menor expressão de mRNA de SIRT1 em tecido adiposo de humanos obesos e em modelos murinos de obesidade;</p> <p>Expressão reduzida de SIRT1 em células mononucleares periféricas do sangue de pacientes com síndrome metabólica</p>	<p>Kapoor <i>et al.</i>, 2009; Qiao & Shao, 2006; Song <i>et al.</i>, 2011b)</p>
--	---	--

1.2.5 SIRT1 e estresse oxidativo

A sirtuína SIRT1 parece regular e ser regulada pelo estresse oxidativo celular. Esta proteína reduz a carga de estresse oxidativo através da deacetilação de FOXO3, que por sua vez aumenta a expressão das moléculas antioxidantes catalase e MnSOD. Desta forma, em resposta ao estresse oxidativo, SIRT1 deacetila fatores de transcrição FOXO, permitindo que estes ativem a expressão de genes pró-sobrevivência celular, induzindo parada de ciclo celular e resistência ao estresse oxidativo (Brunet *et al.*, 2004).

Existem evidências de que quando há estresse oxidativo, como na presença de extrato de fumaça de cigarro, existe uma menor expressão de SIRT1 em células do epitélio pulmonar, células endoteliais e macrófagos (Arunachalam *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2007a). A exposição de fibroblastos humanos a peróxido de hidrogênio (outra forma de estresse oxidativo) leva a redução do mRNA e da proteína de SIRT1, assim como redução da expressão de uma proteína que estabiliza este mRNA (HuR) (Abdelmohsen *et al.*, 2007). Em condições de hiperglicemia, a via SIRT1-FOXO é inibida e ocorre a produção de ROS. A ativação de SIRT1 através do composto resveratrol é capaz de reverter este processo, suprimindo a produção de ROS através da ativação da via SIRT1-FOXO (Yun *et al.*, 2012).

Outro grupo de pesquisadores demonstrou que, em resposta a espécies reativas de oxigênio intracelulares, SIRT1 deacetila, e assim regula a localização subcelular de p53, impedindo sua translocação ao núcleo e permitindo sua translocação para a mitocôndria, tendo como consequência final a liberação do Citocromo C para o citoplasma, que inicia a cascata de apoptose (Han *et al.*, 2008).

Quando há dano de DNA, como no estresse oxidativo, existe um recrutamento de SIRT1 para sítios de quebras de dupla-fita de DNA (O'Hagan *et al.*, 2008; Oberdoerffer *et*

al., 2008). Portanto, dependendo do tipo de estresse celular, as sirtuínas parecem ser influenciadas de formas alternativas que podem envolver desde a redução da sua expressão até a ativação de cascatas que culminam na parada do ciclo celular ou em apoptose.

1.2.6 O papel de SIRT1 no sistema imune e na inflamação

Existem duas vias essenciais para sinalização intracelular da inflamação e que possuem importantes funções no sistema imune inato e adaptativo. Estas são as vias de sinalização por NF- κ B e por AP-1 e ambas são reguladas pela sirtuína SIRT1. Ambas as moléculas são fatores de transcrição envolvidos na regulação da expressão de diversos genes, com relevância na estimulação de citocinas inflamatórias e ativação da resposta imune.

A sirtuína SIRT1 parece possuir funções importantes na inflamação. Uma forma pela qual SIRT1 afeta a inflamação é através da deacetilação e supressão do fator de transcrição AP-1, que resulta na redução da expressão de genes alvos deste fator que estão envolvidos na inflamação, como a Ciclooxigenase2 (COX2). Com a redução de COX2, existe uma menor formação do mediador inflamatório Prostaglandina E₂ (PGE₂) em macrófagos. Esta depressão de PGE₂ é associada com uma melhor função dos macrófagos através de fagocitose e ação tumoricida (Zhang *et al.*, 2010b). A deacetilação de AP-1 por SIRT1 regula negativamente a ativação de linfócitos T. Um estudo demonstrou que camundongos nulos para SIRT1 apresentaram alta ativação de linfócitos T e perda da tolerância periférica (mecanismo de controle periférico de linfócitos autorreativos) e o aumento da expressão de SIRT1 induziu a deacetilação de AP-1 e resultou em anergia destas células (Zhang *et al.*, 2009). Portanto, o fator de transcrição AP-1 também está envolvido na função celular de linfócitos T, sendo essencial na manutenção da anergia clonal de células T.

Outros estudos envolvendo modelos murinos *knockout* e *knockdown* de SIRT1 revelaram que estes animais apresentavam alta ativação do fator NF- κ B e alta liberação de citocinas, ao passo que a ativação de SIRT1 inibia esta liberação de mediadores inflamatórios mediada por NF- κ B em macrófagos (Rajendrasozhan *et al.*, 2008; Schug *et al.*, 2010). Através da ativação de SIRT1 em macrófagos, existe uma menor expressão de genes pró-inflamatórios, o que reduz a inflamação crônica (ver Figura 14 adaptada de (Schug *et al.*, 2010)).

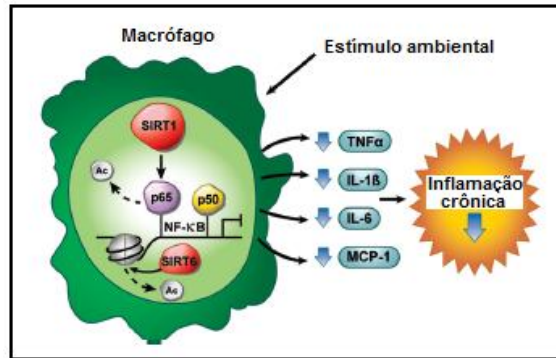


Figura 14. Ativação de SIRT1 reduz a expressão de genes pró-inflamatórios em macrófagos. Adaptado de (Schug *et al.*, 2010).

Quando a expressão de SIRT1 é comparada entre linfócitos T, é observado que os maiores níveis de expressão são encontrados em células T anérgicas, seguidas de células T ativadas e por fim de linfócitos T virgens, que possuem os menores níveis de SIRT1 (Zhang *et al.*, 2009). A anergia periférica de linfócitos T é um mecanismo que previne o desenvolvimento de autoimunidade, onde proteínas supressoras são expressas quando há ligação de um TCR com autoantígeno ligado ao MHC na ausência de sinal coestimulatório. SIRT1 é uma destas proteínas responsáveis por manter a tolerância periférica, visto que a transcrição de SIRT1 é induzida pela sinalização anérgica de linfócitos T mediada pela interação dos fatores FOXO3a e ERG2/3 que se ligam no promotor de SIRT1 e permitem sua transcrição (Gao *et al.*, 2012). Este mesmo estudo indicou que, durante a ativação de linfócitos T, a citocina IL-2 sequestra FOXO3a e suprime SIRT1, permitindo a proliferação e diferenciação de linfócitos T. Desta maneira, a presença de IL-2 reverte a tolerância periférica de linfócitos T.

Linfócitos T de camundongos com deleção *in vitro* para SIRT1 são hiperproliferativos, secretam mais IL-2, IFN γ e IL-5, e são ativados sem a necessidade de coestimulação com a molécula CD28 (Zhang *et al.*, 2009). Esta hiperativação é devida a perda da supressão das vias NF- κ B e AP-1 (Kong *et al.*). A sirtuína SIRT1 também interage com uma proteína muito importante para a replicação do vírus HIV, a proteína Tat. Esta é capaz de se ligar ao domínio catalítico de SIRT1 e, assim, bloquear sua atividade. Com a inibição de SIRT1, NF- κ B se torna hiperacetilado nos linfócitos T CD4+ infectados e ocorre um aumento de genes celulares e virais que induzem hiperativação destes linfócitos e proliferação do HIV (Kwon *et al.*, 2008). SIRT1 também suprime a transcrição de Bclaf1, fator necessário para

a ativação e proliferação de linfócitos T, através da inibição de NF- κ B e da deacetilação de resíduos de lisinas em histonas localizadas no promotor do gene *Bclaf1* (Kong *et al.*, 2011).

Além da inibição de NF- κ B por SIRT1 através da deacetilação, existem outros mecanismos pelos quais SIRT1 suprime a atividade transcricional deste fator. SIRT1 também é capaz de interagir com a transcrição de genes alvo de NF- κ B por se localizar nestes sítios em complexo com a subunidade p65 deste fator e a acetiltransferase p300 (Kong *et al.*, 2011). SIRT1 também interage com o correpressor transcricional TLE1 para suprimir os genes-alvo de NF- κ B (Ghosh *et al.*, 2007). Além disso, em resposta a citocinas inflamatórias, a subunidade p65 de NF- κ B aumenta a transcrição do mRNA de SIRT1, que diminui a atividade de p65, formando um mecanismo de retroalimentação (Kong *et al.*, 2011).

SIRT1 também deacetila Xbp1, que é um componente da *unfolded protein response* (UPR) necessário para a maturação de linfócitos B em plasmócitos e para a secreção de interferon β (IFN β) por macrófagos (Reimold *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2010). Foi verificado que esta deacetilação de Xbp1 suprime a produção de IFN β , e como consequência há inibição da ativação de células do sistema imune inato (Wang *et al.*, 2011).

Foi descoberto recentemente que SIRT1 deacetila e inibe STAT3 (Nie *et al.*, 2009) e, desta forma, possui papel na mediação da diferenciação de linfócitos CD4+. O fator STAT3, que está envolvido com um fenótipo pró-inflamatório de linfócitos T, regula genes que medeiam a diferenciação destes linfócitos Th em linfócitos Th2 ou Th17 quando estimulado por citocinas (Yang *et al.*, 2007b). Adicionalmente, STAT3 é responsável pelo aumento da migração de linfócitos T para sítios de inflamação através da elevação na expressão da molécula CCL5 por estas células (McLoughlin *et al.*, 2005).

As moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II) são importantes na estimulação de linfócitos T CD4+ e estão presentes em células apresentadoras de antígenos (APCs). Para ocorrer a expressão do MHC II, é necessário que o fator CIITA (MHC II Transactivator) recrute e forme um complexo protéico que medeia a transativação do promotor de MHC II, permitindo sua transcrição. Um estudo demonstrou que CIITA é deacetilado pela sirtuína SIRT1, e esta modificação estabiliza

este fator, reforçando a transativação de MHC II. A transcrição deste MHC depende da deacetilação ativa de CTIIA por SIRT1 (Wu *et al.*, 2011).

Outra forma pela qual SIRT1 afeta o sistema imune é através da deacetilação do fator Foxp3. Foxp3 é um fator de transcrição essencial para a diferenciação de linfócitos T em linfócitos Treg. Quando Foxp3 está hiperacetilado, este fator se torna mais estável e menos susceptível à degradação. O tratamento de linfócitos T com nicotinamida (inibidor de SIRT1) resultou em maior acetilação de Foxp3, níveis mais elevados de Foxp3 e maior número de células Treg com capacidade supressora em humanos e camundongos (van Loosdregt *et al.*, 2010).

A Figura 15 ilustra a participação de SIRT1 no sistema imunológico, salientando seus alvos e consequências de sua atuação.

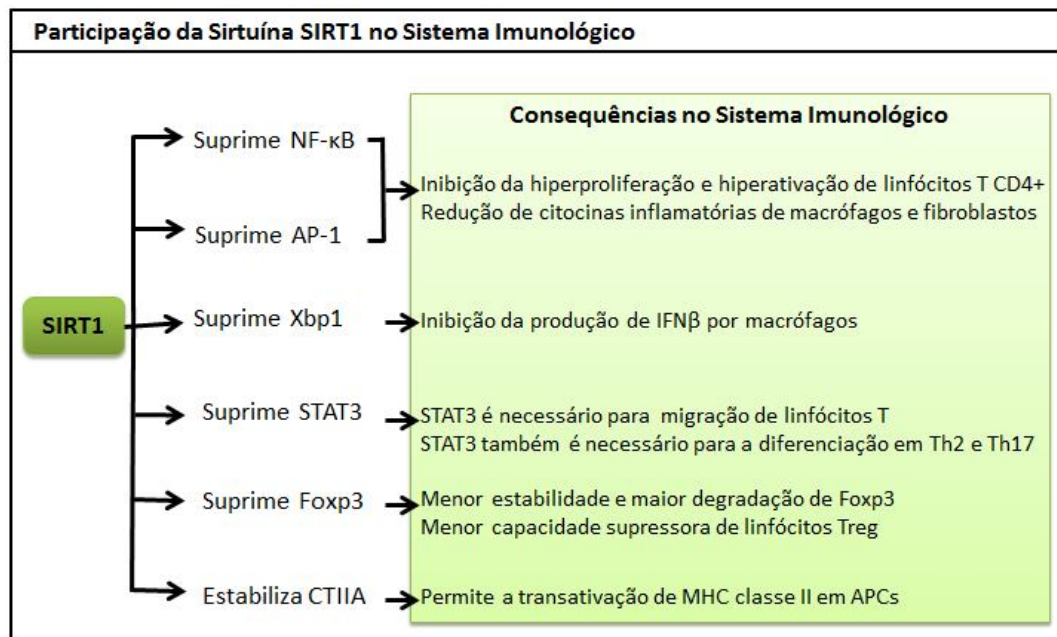


Figura 15. Participação de SIRT1 no sistema imunológico.

Estudos com camundongos *knockout* para SIRT1 demonstraram que estes tinham, com grande frequência, inflamação nas pálpebras quando jovens e, aos dois anos, apresentavam um fenótipo característico de lúpus, com hiperativação de linfócitos T, grande quantidade de anticorpos anti-nucleares, deposição de imunocomplexos de IgM e IgG nos rins e no fígado (Sequeira *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). Entretanto, foi demonstrado que somente a deleção de SIRT1 em linfócitos T CD4+ de camundongos não alterou a ativação,

proliferação e produção de citocinas por estas células; adicionalmente, foi indicado que a deleção de SIRT1 em linfócitos T regulatórios destes camundongos reforçou as funções imunossupressoras destes linfócitos Treg, resultando em uma maior aceitação de enxertos cardíacos com incompatibilidade de MHC (Beier *et al.*, 2011). A divergência entre estes estudos pode ser atribuída ao fato que possivelmente a expressão de SIRT1 em todo o organismo afete o desenvolvimento do sistema imune.

As funções anti-inflamatórias de SIRT1 já foram bem documentadas, mas ainda não é claro como esta sirtuína é regulada em condições inflamatórias e em doenças autoimunes. Com o tratamento da citocina pró-inflamatória TNF- α em células do músculo liso vascular, houve uma elevação nos níveis de mRNA e da proteína de SIRT1 devido à ligação de NF- κ B no promotor de SIRT1 (Zhang *et al.*, 2010a). Em um estudo de Niederer e colaboradores, foi visto que SIRT1 também é superexpressa em fibroblastos do tecido sinovial de pacientes com a doença inflamatória autoimune artrite reumatóide (RA) (Niederer *et al.*, 2011). Neste trabalho, o tratamento destes fibroblastos e de monócitos sanguíneos com TNF- α elevou os níveis de mRNA e proteína de SIRT1 e foi observado que os níveis dessa proteína também afetaram positivamente a produção de mediadores pró-inflamatórios IL-6 e IL-8. SIRT1 também parece possuir atividade pró-inflamatória nos monócitos de RA, visto que a maior expressão de SIRT1 induz a produção de TNF- α por estas células, dependente da via NF- κ B. Outro grupo de pesquisadores demonstrou que o tratamento com o inibidor de sirtuínas Sirtinol reduziu a resposta inflamatória em resposta a TNF- α através da supressão de SIRT1 em células endoteliais microvasculares da derme (Orecchia *et al.*, 2011). Em contraste, em um estudo realizado por Zhu e colaboradores, o tratamento de fibroblastos com resveratrol induziu a ativação de SIRT1, que deacetilou e suprimiu a atividade de NF- κ B e a expressão de moléculas pró-inflamatórias na presença de TNF- α , exercendo efeitos anti-inflamatórios (Zhu *et al.*, 2011). Em outro trabalho, foi verificado que o modelo de colite induzida por sulfato de sódio dextran em camundongos é associado a menores níveis de SIRT1 e ativação de NF- κ B e o tratamento destes camundongos com resveratrol reverteu a colite através do aumento da expressão de SIRT1 (Singh *et al.*, 2010). Desta forma, os efeitos de SIRT1 sobre a inflamação e vice-versa parecem ser regulados por processos complexos. A forma pela qual processos inflamatórios regulam a expressão de SIRT1 junto da regulação de

diferentes substratos celulares por esta enzima parece depender do tipo celular e das condições fisiopatológicas envolvidas.

1.2.7 SIRT1 e Lúpus Eritematoso Sistêmico

No item 1.1.9 (Epigenética) salientamos que camundongos *lupus-prone* apresentam uma hipacetilação global das histonas H3 e H4 de linfócitos T CD4+ (Garcia *et al.*, 2005). Um estudo realizado por Hu e colaboradores em 2008 indicou que existe um aumento da expressão do mRNA de SIRT1 em linfócitos T CD4+ de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, acompanhado pela redução da acetilação global de H3 e H4 nesta células em comparação a controles (Hu *et al.*, 2008). Este mesmo estudo mostrou que o nível de acetilação global de H3 está inversamente correlacionado com o índice de atividade da doença SLEDAI. Em 2009, este mesmo grupo de pesquisa demonstrou que também há um aumento da expressão de mRNA e da proteína SIRT1 em linfócitos T CD4+ esplênicos de camundongos propensos a lúpus MRL/lpr (Hu *et al.*, 2009). Ao tratar estas células com pequenos RNAs de interferência (siRNA) para SIRT1, foi observado que com a diminuição da expressão de SIRT1, os níveis globais de acetilação de H3 e H4 aumentaram; a injeção de SIRT1-siRNA também resultou na redução de níveis de anticorpos anti-dsDNA e melhora do perfil renal. Estes resultados sugerem que a superexpressão de SIRT1 contribui para o mecanismo patogênico de lúpus e que sua inibição pode ser terapêutica.

Como mencionado anteriormente, na presença de TNF- α , a deacetilação de NF- κ B por SIRT1 parece sensibilizar as células à apoptose e pacientes com LES possuem níveis elevados de TNF- α no soro (Aringer *et al.*, 2002; Yeung *et al.*, 2004). No trabalho de Habib e colaboradores, foi demonstrado que linfócitos T de pacientes com LES são mais susceptíveis à apoptose na presença de TNF- α que controles saudáveis (Habib *et al.*, 2009). Além do possível papel de SIRT1 na deacetilação global de histonas (Hu *et al.*, 2009), pode-se também especular que SIRT1 esteja envolvida na patogênese de LES por deacetilar e suprimir NF- κ B, permitindo maior sensibilização a apoptose por TNF- α em linfócitos T.

Em resumo, apesar de alguns estudos serem controversos, pode-se visualizar que SIRT1 parece ser um elemento crucial para regulação do sistema imune normal e para a patogênese de doenças autoimunes como o LES. A manutenção dos níveis de SIRT1

parece ser necessária para a prevenção do desenvolvimento de LES, visto que com o *knockout* de *SIRT1* há o desenvolvimento da autoimunidade semelhante a lúpus em camundongos, com perda da tolerância periférica, hiperativação de linfócitos T, presença de anticorpos antinucleares e deposição de imunocomplexos em rins e fígado. Entretanto, após o desenvolvimento da doença, pode-se observar que existe um aumento da expressão de *SIRT1* em linfócitos T CD4+, tanto de camundongos como de pacientes, e esta expressão elevada reflete em níveis de hipacetilação de histonas H3 e H4, sendo que o status de acetilação desta primeira se correlaciona negativamente com a atividade da doença. Desta forma, *SIRT1* parece contribuir para a etiologia, para a patogênese e para a morbidade associada ao lúpus de maneiras ainda não tão claras. Torna-se, portanto, necessária uma análise de variantes genéticas de *SIRT1* a fim de esclarecer o papel desta molécula na susceptibilidade ao LES, assim como na morbidade associada a esta patologia.

2. Objetivos

O presente projeto de mestrado possui como objetivos gerais a investigação do papel de polimorfismos da região promotora do gene *SIRT1* na susceptibilidade a lúpus eritematoso sistêmico. Os objetivos específicos principais consistem na avaliação das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos rs12778366 e rs3758391 e das frequências dos haplótipos formados pelos respectivos polimorfismos em pacientes com LES e controles saudáveis, assim como a análise de correlações entre parâmetros clínicos e estas variantes genéticas. Como objetivos específicos secundários, serão avaliadas também as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas, juntamente com as correlações de parâmetros clínicos dos polimorfismos de baixa frequência alélica localizados proximamente aos respectivos SNPs: rs10740280, rs143094735, rs71971907, rs146157701, rs140114858, rs142146381. Além disso, este será o primeiro estudo de associação envolvendo polimorfismos do gene *SIRT1* e a susceptibilidade a uma doença inflamatória autoimune sistêmica – LES.

3. Artigo

Artigo em fase de preparação com formatação para ser submetido à revista científica *Journal of Rheumatology*. Este periódico, que possui índice de impacto de 3,69, é direcionado para temas relacionados à pesquisa com doenças reumatológicas.

Título: “*SIRT1* promoter polymorphisms as clinical modifiers on systemic lupus erythematosus”.

***SIRT1* promoter polymorphisms as clinical modifiers on systemic lupus erythematosus**

Camila Rosat Consiglio, Juliana da Silveira Schauern, Odirlei André Monticielo, Ricardo Machado Xavier, João Carlos Tavares Brenol, José Artur Bogo Chies.

Abstract:

Objective. *Silent mating type Information Regulator 2 homolog 1* (*SIRT1*) is a deacetylase protein that participates in several physiological processes with importance in transcriptional silencing, apoptosis, immune system regulation and inflammation. Systemic lupus erythematosus (SLE) is an inflammatory autoimmune disease in which upregulated expression of *SIRT1* on CD4⁺ T lymphocytes of active patients has been reported. Also, global hypoacetylation of histones H3 and H4, with H3 hypoacetylation was correlated with a higher disease activity index. *SIRT1* promoter SNPs rs12778366 and rs3758391 may account for differential expression of this molecule and the role of these variants was investigated in SLE susceptibility and morbidity.

Methods. Genomic DNA was extracted from peripheral blood of 367 SLE patients and 290 healthy controls. *SIRT1* SNPs rs12778366 and rs3758391 were amplified through PCR and genotyped through sequencing.

Results. No statistically significant differences were observed between patients and controls for allelic, genotypic or haplotypic frequencies. Nevertheless, *SIRT1* rs3758391 SNP was not in Hardy-Weinberg equilibrium, presenting an excess of CC and TT homozygous both in patients and controls. SLE patients with TT and CT genotypes

displayed a higher chance of developing lupus nephritis ($P_{\text{corr}}=0.012$, $OR=2.04$ 95% CI 1.32 – 3.14) and presented a higher disease activity index (Mean rank 170.95 vs 137.26, $P_{\text{corr}}=0.006$) when compared with CC homozygous patients.

Conclusion. Our results suggest that SNP rs3758391 modifies SLE morbidity, with rs3758391 T allele being a risk factor for nephritis and a higher SLEDAI. Nevertheless, it remains to be elucidated how the *SIRT1* rs3758391 variation functionally influences SLE severity.

Key indexing terms: SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS, SIRT1, IMMUNOGENETICS, NEPHRITIS, SLEDAI

Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul and Genetics and Molecular Biology Post-Graduate Program (PPGBM) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Financial support: This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) grants 134902/2011-4 and 306349/2011-6 and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul).

C.R. Consiglio, M.Sc., Genetics and Molecular Biology Post-Graduate Program (PPGBM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; J.S. Schauren, M.Sc., PPGBM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; O.A. Monticelo, PhD, Rheumatology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; R.M. Xavier, PhD, Rheumatology Division, Hospital de Clínicas de Porto

Alegre, Porto Alegre, Brazil; J.C.T. Brenol, PhD, Rheumatology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; J.A.B. Chies, PhD, Genetics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul and PPGBM Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Address for reprints and correspondence:

José A. B. Chies

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Genetics Department

Av. Bento Gonçalves 9500 Prédio 43323

Porto Alegre, RS, CEP 91501-970 Brazil

Short running footline: SIRT1 polymorphisms in SLE

Introduction:

Silent mating type Information Regulator 2 homolog 1 (SIRT1) is a NAD⁺-dependent deacetylase that has been shown to play important roles in calorie restriction, aging, metabolism and apoptosis – reviewed in (1). SIRT1 can be observed in the nucleus and cytoplasm of a variety of tissues and it has been reported that this enzyme is able to promote deacetylation of lysine residues (K) on histones (H), such as H1K26, H3K9, H3K14, H3K56 and H4K16, resulting in transcriptional silencing (2-4). Additionally, SIRT1 also deacetylates non-histone proteins and transcription factors, many of which affect the immune system and inflammation – reviewed in (5). Deacetylation of AP-1 transcriptional factor by SIRT1 results in lower production of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in macrophages (6) and T cell anergy induction and decreased production of IL-2 by T cells (7). SIRT1 also deacetylates the p65 subunit of NF- κ B, suppressing its transcriptional activity (8). As a consequence, cells become sensitized to TNF- α -induced apoptosis (8), macrophages and fibroblasts have a reduction in proinflammatory gene expression and cytokine release (9, 10) and endothelial cells diminish the expression of adhesion molecules (11). SIRT1 is also implicated in establishing peripheral tolerance, as SIRT1 levels are higher in anergic T cells (7) and its transcription has been demonstrated to be induced by anergic T cell signaling (12). Moreover, *Sirt1* knockout mice exhibit loss of peripheral tolerance, hyperactivation and hyperproliferation of T lymphocytes, presence of antinuclear autoantibodies (ANA) and immune complex deposition in kidneys and liver, displaying a lupus phenotype (7, 13).

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory disorder that involves autoantibody production, immune complex deposition and tissue inflammation and damage. SLE has a multifactorial etiology, being characterized by heterogeneous

manifestations that may affect a diversity of tissues and systems, such as the skin, joints, kidneys, hematopoietic and central nervous system. SLE has an incidence rate of 4.8 to 8.7 cases per 100.000 habitants in Brazil (14, 15) and is more frequent among women and individuals with African ancestry (16, 17). Hu *et al* have observed increased SIRT1 mRNA levels and global hypoacetylation of histones H3 and H4 in CD4+ T lymphocytes of active SLE patients (18). Also, global H3 acetylation levels inversely correlated with SLE disease activity index (SLEDAI). This trend was also observed in MRL/lpr lupus-prone mice and SIRT1-siRNA treatment of splenic CD4+ T lymphocytes resulted in higher H3 and H4 acetylation levels, reduction of autoantibodies and attenuation of kidney damage in these mice (19).

SIRT1 is located on chromosome 10 (10q21.3) and polymorphic variants of this gene have been studied in the susceptibility of several disorders, such as metabolic and neurodegenerative diseases (20-22). Promoter region variants may account for differential *SIRT1* expression, rendering individuals susceptible to certain pathologies (20, 23-25). Due to the involvement of SIRT1 in the immune system, inflammation and SLE pathology, the aim of this study was to analyze the *SIRT1* promoter region polymorphisms rs3758391 and rs12778366 in relation to genetic susceptibility to SLE and its importance to SLE clinical manifestations. This is the first study to address a potential role of *SIRT1* on genetic susceptibility in an inflammatory autoimmune disease.

Material and methods:

Patients

Blood samples were collected from 367 SLE patients from the Division of Rheumatology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) in Porto Alegre, RS,

Brazil. The patients were diagnosed according to the American College of Rheumatology (ACR) revised criteria for SLE. SLEDAI was applied to patients as a measure of disease activity. Blood samples of 290 healthy controls were also collected from blood donors of HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil. The protocol of this study was approved by the Ethics Committee (CEP-HCPA 00-145 and 05-063) and written informed consent was obtained from all individuals studied.

Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples by salting out technique. Specific primers were designed for the *SIRT1* gene promoter region encompassing rs3758391 and rs12778366 SNPs: SIRT1-F 5' CAGAGGGATTGGTATGAAGGAACGC 3' and SIRT1-R 5' AGCCCTTCCACTTTCCTCTCTCCCT 3'. Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a 25 μ L reaction with final concentrations as follows: 1x PCR Buffer, dNTP 0.4 mM, MgCl₂ 1.5 mM, 10 μ mol/ μ L of each primer, 1U of Platinum *Taq* DNA Polymerase and 100ng of genomic DNA. The initial denaturation cycle was performed at 94°C for 5min, followed by 40 cycles of 94°C for 45s, 63.4°C for 30s and 72°C for 1min and a final extension cycle of 72°C for 5min. The PCR products of 911 bp were quantified by Low Mass (Invitrogen-Life Technologies, São Paulo, Brazil) in 1% agarose gels and samples concentrations of 10-50 ng/ μ L were selected. PCR products were then sequenced using SIRT1-F primer in an ABI 3730 XL DNA Sequencer according to the manufacturer's manual. Genotyping of the sequenced data was performed through sequencing FinchTV software version 1.4.0 and the results were manually checked. Two main polymorphisms, rs12778366 and rs3758391, were analyzed due to previously described influence in differential SIRT1 expression. The sequencing data also allowed

analysis of SNPs rs10740280, rs143094735, rs71971907, rs146157701, rs140114858 and rs142146381. The variant rs140114858, although evaluated and identified as polymorphic in the present work, is no longer described on SNP databanks.

Statistical Analysis

Statistical analysis were performed using SPSS Software (SPSS Inc., Chicago, IL) and WinPepi (26). The significance level of analysis was set at $\alpha = 0.05$ (two tailed). Hardy-Weinberg (HW) expectations, allelic and genotypic frequencies were compared using chi-squared tests, using Yates correction when necessary. Haplotype frequencies were estimated by MLocus Software (27). Clinical manifestations of SLE were analyzed by chi-square tests. Bonferroni correction for multiple comparisons was applied when the resulting *P* value was significant. Mean rank of first SLEDAI scores (i.e., the SLEDAI at diagnosis) were compared using Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests.

Results:

A total of 367 SLE patients and 290 healthy controls were analyzed for *SIRT1* promoter rs3758391 and rs12778366 polymorphisms. Mean age of patients was 45.9 ± 14.5 years and of controls was 44.2 ± 8.4 years at blood withdrawal. Mean age of patients at diagnosis was 32.5 ± 13.7 years. Table 1 displays clinical and demographic features of patients and controls.

As genotypic frequencies did not differ among ethnicity and gender in SLE patients and controls for both *SIRT1* rs12778366 and rs3758391 polymorphisms (the major variants evaluated in the present study), the data was compared taking all patients as a single group, without stratification. No departures from Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) were detected when comparing *SIRT1* rs12778366 genotypes in patients and controls ($X^2=0.55$,

$P=0.46$; $X^2=0.28$, $P=0.60$, respectively). Nonetheless, a deviation of the HWE was observed in both patients and controls regarding *SIRT1* rs3758391 SNP, with an excess of CC and TT homozygous in both groups ($X^2=4.89$, $P=0.027$; $X^2=6.02$, $P=0.014$, respectively). Considering that, sequences were manually checked in order to avoid sequencing errors due to specific DNA tertiary structures.

Systemic lupus erythematosus clinical features were accessed to investigate the genetic influence of *SIRT1* in disease activity and morbidity. Preliminary analysis of *SIRT1* rs12778366 SNP in SLE disease outcome revealed an association with SLE photosensitivity; nonetheless, significance was lost after correction for multiple comparisons. Initial analysis of *SIRT1* rs3758391 polymorphism indicated an association between this SNP and SLE clinical manifestations of SLEDAI, discoid rash, nephritis and immunological disorder, the last being ascribed to anti-Sm and anti-Ro autoantibodies (data not shown). However, after correction for multiple comparisons, only the associations of SLEDAI and nephritis remained statistically significant (Table 2). Patients bearing *SIRT1* rs3758391 TT and CT genotypes presented a higher mean first SLEDAI than CC homozygous ($P_{\text{corr}}=0.024$, mean SLEDAI 3.87 ± 4.82 , 3.51 ± 4.99 and 1.92 ± 3.07 , respectively – table 2). Since SLEDAI did not follow a normal distribution, non-parametric tests were applied. As patients with TT and CT genotype did not differ statistically among first SLEDAI mean rank, they were analyzed together in a dominant model. The results indicated that carriers of the T allele display a higher SLEDAI mean rank than CC patients (170.95 vs 137.26, $P_{\text{corr}}=0.006$ – table 2). Additionally, we observed a higher frequency of nephritis among SLE patients carrying the rs3758391 T allele when compared with CC homozygous patients ($P_{\text{corr}}=0.012$, OR=2.04 95% CI 1.32 – 3.13, table 2).

Analysis of allelic and genotypic frequencies of *SIRT1* rs12778366 SNPs in patients and controls indicated no association with SLE susceptibility ($P=0.287$ and $P=0.558$, respectively; table 3). Also, no differences were detected between patients and controls concerning *SIRT1* rs3758391 variants ($P_{\text{genotype}}=0.877$, $P_{\text{allele}}=0.707$, table 3). The *SIRT1* rs12778366 and rs3758391 variants were shown to be in mild linkage disequilibrium ($R^2_{\text{patients}}=0.219$ and $R^2_{\text{controls}}=0.252$). When comparing haplotypic frequencies of *SIRT1* rs12778366 and rs3758391 variants, we observed three haplotypes T-T, C-T and T-C; moreover, haplotypic frequencies did not differ between patients and controls ($P=0.75$; table 3).

Further investigation was performed concerning low frequency allele polymorphisms present on the region covered by the sequenced *SIRT1* promoter amplicon. Polymorphisms rs10740280 (-1759), rs143094735 (-1476), rs71971907 (-1442), rs146157701 (-1289), rs140114858 (-1213) and rs142146381 (-1142) were detected. SNPs rs71971907 and rs142146381 were monomorphic in patients and controls, while the remaining variants presented allele frequency of maximum 0.52%, ascribed to the presence of rare heterozygous (data not shown). Worthy of note, the only two SLE patients with *SIRT1* rs143094735 CT genotype were positive for neurologic disorders. Moreover, one of these patients was also negative for the presence of antinuclear antibody, a quite unusual finding among SLE patients.

Discussion:

In the present study, we investigated the role of the *SIRT1* promoter region rs12778366 and rs3758391 polymorphic variants in SLE susceptibility and clinical outcome. The involvement of SIRT1 in peripheral tolerance, inflammation, apoptosis and

transcriptional silencing indicates a possible participation of this molecule in the SLE etiopathogenesis. This study was the first to address the influence of genetic variants of the *SIRT1* gene in the development of an autoimmune disease.

Among the clinical features analyzed, our results pointed to a role of SIRT1 in disease outcome, as the frequency of *SIRT1* rs3758391 variant was statistically different considering SLEDAI and nephritis. Patients that presented the rs3758391 T allele had higher mean rank in SLEDAI than C homozygous (170.95 vs 137.26, $P_{\text{corr}}=0.006$). A protective effect of *SIRT1* rs3758391 SNP has also been observed in other conditions besides lupus severity. For example, the CC genotype was more frequent among healthy aged as compared to younger subjects (OR=3.04, $P=0.027$) (28). Also, rs3758391 heterozygous presented lower hazard ratio for cardiovascular mortality in elderly subjects (HR=0.77, $P=0.018$) (29). The *SIRT1* rs3758391 polymorphism is located in the promoter region, at a p53-binding site, close to a HIC1 binding sequence (24). The T allele binds with more affinity to p53 and is less susceptible to HIC1-induced repression under nutrient stress (24). In this context, TT and CT genotypes lead to increased SIRT1 expression in skeletal muscle of overweight individuals under 6 months of calorie restriction when compared to the CC genotype. Since it has been shown that active SLE patients present CD4+ T lymphocytes that express higher levels of SIRT1 mRNA, global hypoacetylation and also have a higher SLEDAI score that correlates with H3 hypoacetylation (18), and that SIRT1-siRNA treatment of CD4+ T lymphocytes of lupus-prone mice enhances global acetylation levels of H3 and H4, reduces levels of anti-dsDNA antibodies and improves kidney damage (19), it is tempting to speculate that the association found between *SIRT1* rs3758391 T allele with a higher SLEDAI may be explained by higher levels of SIRT1 in CD4+ T lymphocytes, possibly having an impact on histone hypoacetylation. Also, since

SLE patients present higher serum levels of TNF- α (30) and T lymphocytes more susceptible to TNF- α -induced apoptosis (31) and as SIRT1 can deacetylate NF- κ B, sensitizing cells to TNF- α -induced apoptosis (8), SIRT1 expression may be involved with a higher SLEDAI through induction of apoptosis. However, the correlation between the T allele and a higher SIRT1 expression is controversial, since using a luciferase reporter gene assay, Rai et al. were unable to evidence any difference on *SIRT1* expression in relation to rs3758391 genotypes (23).

Another indication of *SIRT1* genotype contribution to disease burden was highlighted by the fact that rs3758391 T allele carriers also presented a higher risk of developing nephritis when compared to patients with the CC genotype (OR=2.04, P_{corr} =0.012, 95% CI 1.32 – 3.13). Lupus nephritis is a SLE clinical manifestation that may result from deposition of preformed serum immune complexes and binding of autoantibodies to glomerular antigens *in situ*, resulting in intense kidney inflammation. As aforementioned, it is possible that, under SLE conditions, the *SIRT1* rs3758391 T allele differentially induces SIRT1 expression, influencing on histone global acetylation levels in CD4+ lymphocytes, production of autoantibodies, kidney damage and SLEDAI. This mechanism remains to be elucidated through further functional studies.

Additionally, the influence of SIRT1 in renal function may lie on its ability to deacetylate non-histone substrates in this organ, since its expression has already been shown to exert protective effects in the kidneys in different situations (32-34). Nonetheless, it remains to be determined whether SIRT1 expression is nephroprotective in lupus nephritis patients and how the rs3758391 polymorphism influences *SIRT1* gene expression in this organ.

According to our data, *SIRT1* promoter rs12778366 and rs3758391 polymorphisms are not associated with SLE susceptibility in a Southern Brazilian population, as shown by no differences in allelic, genotypic and haplotypic frequencies between patients and controls (rs12778366: $P_{\text{allele}}=0.287$, $P_{\text{genotype}}=0.558$; rs3758391: $P_{\text{allele}}=0.877$, $P_{\text{genotype}}=0.707$; $P_{\text{haplotype}}=0.75$). Previous studies have investigated the role of the *SIRT1* rs12778366 SNP in several disorders, having found no association with this polymorphism and diabetic nephropathy, major depressive disorder, schizophrenia, bipolar disorder and metamphetamine-induced psychosis (25, 35-37). The *SIRT1* rs3758391 T allele has been associated with type 2 diabetes (OR=1.36, $P=0.022$) (20). On the other hand, the *SIRT1* rs3758391 polymorphism has been studied in the context of aging by different research groups, with controversial results of its influence on longevity (28, 29, 38). It is relevant to highlight that, in our population, while the rs12778366 SNP was in HWE, the rs3758391 genetic marker deviated from HW expectations in both patients and controls, due to a rise in the frequency of TT and CC homozygous. The aforementioned studies of *SIRT1* rs3758391 variant all reported no departures from HWE in the Dutch, German and Han Chinese populations. Our excess of both homozygous could be an indicative of a disruptive selection in the Southern Brazilian population. Notwithstanding, it is also possible that this finding is a result of linkage disequilibrium (LD) with another polymorphism of the *SIRT1* gene. In fact, this variant has been described to be in LD with other SNPs throughout the *SIRT1* gene (29, 38). As there are no reports of other studies on *SIRT1* polymorphic variants in Brazil, other Brazilian population should be investigated in order to determine whether this homozygous excess is exclusively found in this region of Brazil.

The frequency of *SIRT1* rare promoter variants have also been accessed in the present study. Worthy of note, the only two SLE patients with *SIRT1* rs143094735 CT genotype were positive for neurologic disorders. Moreover, one of these patients was also negative for the presence of antinuclear antibody, a quite unusual finding among SLE patients (among our 364 patients, only 2 were negative for the presence of antinuclear antibodies). Rare variants may exert substantial effect on the susceptibility of a trait and, as highlighted by Manolio *et al*, identification of rare variants may be important to elucidate possible functional regions of the genome and to help explain the missing genetic variance underlying complex diseases (39).

In conclusion, our results indicate that although the *SIRT1* gene rs3758391 and rs12778366 polymorphisms do not seem to influence lupus susceptibility, rs3758391 T allele is a risk factor for higher disease activity and lupus nephritis development and, therefore *SIRT1* can be viewed as a clinical modifier of SLE. Nonetheless, functional studies should be addressed in order to elucidate how the *SIRT1* rs3758391 polymorphism is truly affecting SLE morbidity.

Conflict of interest:

The authors declared no conflict of interest.

References:

1. Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* 2009;460:587-91.
2. Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell* 2004;16:93-105.
3. Vaquero A, Sternglanz R, Reinberg D. NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene* 2007;26:5505-20.
4. Yuan J, Pu M, Zhang Z, Lou Z. Histone H3-K56 acetylation is important for genomic stability in mammals. *Cell Cycle* 2009;8:1747-53.
5. Kong S, McBurney MW, Fang D. Sirtuin 1 in immune regulation and autoimmunity. *Immunol Cell Biol* 2012;90:6-13.
6. Zhang R, Chen HZ, Liu JJ, Jia YY, Zhang ZQ, Yang RF, et al. SIRT1 suppresses activator protein-1 transcriptional activity and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *J Biol Chem* 2010;285:7097-110.
7. Zhang J, Lee SM, Shannon S, Gao B, Chen W, Chen A, et al. The type III histone deacetylase Sirt1 is essential for maintenance of T cell tolerance in mice. *J Clin Invest* 2009;119:3048-58.
8. Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, et al. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 2004;23:2369-80.
9. Schug TT, Xu Q, Gao H, Peres-da-Silva A, Draper DW, Fessler MB, et al. Myeloid deletion of SIRT1 induces inflammatory signaling in response to environmental stress. *Mol Cell Biol* 2010;30:4712-21.
10. Zhu X, Liu Q, Wang M, Liang M, Yang X, Xu X, et al. Activation of Sirt1 by resveratrol inhibits TNF-alpha induced inflammation in fibroblasts. *PLoS One* 2011;6:e27081.
11. Stein S, Schafer N, Breitenstein A, Besler C, Winnik S, Lohmann C, et al. SIRT1 reduces endothelial activation without affecting vascular function in ApoE^{-/-} mice. *Aging (Albany NY)* 2010;2:353-60.
12. Gao B, Kong Q, Kemp K, Zhao YS, Fang D. Analysis of sirtuin 1 expression reveals a molecular explanation of IL-2-mediated reversal of T-cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:899-904.
13. Sequeira J, Boily G, Bazinet S, Saliba S, He X, Jardine K, et al. sirt1-null mice develop an autoimmune-like condition. *Exp Cell Res* 2008;314:3069-74.
14. Nakashima CA, Galhardo AP, Silva JF, Fiorenzano GR, Santos AB, Leite MF, et al. Incidence and clinical-laboratory aspects of systemic lupus erythematosus in a Southern Brazilian city. *Rev Bras Reumatol* 2011;51:231-9.
15. Vilar MJ, Sato EI. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus* 2002;11:528-32.
16. YacoubWasef SZ. Gender differences in systemic lupus erythematosus. *Gend Med* 2004;1:12-7.
17. McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA, Jr., Ramsey-Goldman R, LaPorte RE, Kwok CK. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum* 1995;38:1260-70.

18. Hu N, Qiu X, Luo Y, Yuan J, Li Y, Lei W, et al. Abnormal histone modification patterns in lupus CD4+ T cells. *J Rheumatol* 2008;35:804-10.
19. Hu N, Long H, Zhao M, Yin H, Lu Q. Aberrant expression pattern of histone acetylation modifiers and mitigation of lupus by SIRT1-siRNA in MRL/lpr mice. *Scand J Rheumatol* 2009;38:464-71.
20. Cruz M, Valladares-Salgado A, Garcia-Mena J, Ross K, Edwards M, Angeles-Martinez J, et al. Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City. *Diabetes Metab Res Rev* 2010;26:261-70.
21. Clark SJ, Falchi M, Olsson B, Jacobson P, Cauchi S, Balkau B, et al. Association of sirtuin 1 (SIRT1) gene SNPs and transcript expression levels with severe obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2011;20:178-85.
22. Zhang A, Wang H, Qin X, Pang S, Yan B. Genetic analysis of SIRT1 gene promoter in sporadic Parkinson's disease. *BiochemBiophys Res Commun* 2012;422:693-6.
23. Rai E, Sharma S, Kaul S, Jain K, Matharoo K, Bhanwer AS, et al. The interactive effect of SIRT1 promoter region polymorphism on type 2 diabetes susceptibility in the North Indian population. *PLoS One* 2012;7:e48621.
24. Naqvi A, Hoffman TA, DeRicco J, Kumar A, Kim CS, Jung SB, et al. A single-nucleotide variation in a p53-binding site affects nutrient-sensitive human SIRT1 expression. *Hum Mol Genet* 2011;19:4123-33.
25. Maeda S, Koya D, Araki S, Babazono T, Umezono T, Toyoda M, et al. Association between single nucleotide polymorphisms within genes encoding sirtuin families and diabetic nephropathy in Japanese subjects with type 2 diabetes. *ClinExpNephrol* 2010;15:381-90.
26. Abramson JH. WINPEPI (PEPI-for-Windows): computer programs for epidemiologists. *EpidemiolPerspectInnov* 2004;1:6.
27. Long JC. Multiple Locus Haplotype Analysis, Version 3.0. Software and Documentation Distributed by the Author 1999; Ann Arbor: Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School.
28. Zhang WG, Bai XJ, Chen XM. SIRT1 variants are associated with aging in a healthy Han Chinese population. *ClinChimActa* 2010;411:1679-83.
29. Kuningas M, Putter M, Westendorp RG, Slagboom PE, van Heemst D. SIRT1 gene, age-related diseases, and mortality: the Leiden 85-plus study. *J Gerontol A BiolSci Med Sci* 2007;62:960-5.
30. Aringer M, Feierl E, Steiner G, Stummvoll GH, Hofler E, Steiner CW, et al. Increased bioactive TNF in human systemic lupus erythematosus: associations with cell death. *Lupus* 2002;11:102-8.
31. Habib HM, Taher TE, Isenberg DA, Mageed RA. Enhanced propensity of T lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus to apoptosis in the presence of tumour necrosis factor alpha. *Scand J Rheumatol* 2009;38:112-20.
32. Fan H, Yang HC, You L, Wang YY, He WJ, Hao CM. The histone deacetylase, SIRT1, contributes to the resistance of young mice to ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Kidney Int* 2013;83:404-13.
33. Kume S, Haneda M, Kanasaki K, Sugimoto T, Araki S, Isono M, et al. Silent information regulator 2 (SIRT1) attenuates oxidative stress-induced mesangial cell apoptosis via p53 deacetylation. *Free RadicBiol Med* 2006;40:2175-82.

34. Kume S, Haneda M, Kanasaki K, Sugimoto T, Araki S, Isshiki K, et al. SIRT1 inhibits transforming growth factor beta-induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation. *J BiolChem* 2007;282:151-8.
35. Kishi T, Yoshimura R, Kitajima T, Okochi T, Okumura T, Tsunoka T, et al. SIRT1 gene is associated with major depressive disorder in the Japanese population. *J Affect Disord* 2010;126:167-73.
36. Kishi T, Fukuo Y, Okochi T, Kitajima T, Ujike H, Inada T, et al. No significant association between SIRT1 gene and methamphetamine-induced psychosis in the Japanese population. *Hum Psychopharmacol* 2011;26:445-50.
37. Kishi T, Fukuo Y, Kitajima T, Okochi T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, et al. SIRT1 gene, schizophrenia and bipolar disorder in the Japanese population: an association study. *Genes Brain Behav* 2011;10:257-63.
38. Flachsbart F, Croucher PJ, Nikolaus S, Hampe J, Cordes C, Schreiber S, et al. Sirtuin 1 (SIRT1) sequence variation is not associated with exceptional human longevity. *ExpGerontol* 2006;41:98-102.
39. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 2009;461:747-53.

Table 1 Clinical and demographic features of patients and controls

Features	N ^a (%)	Mean ± SD
Controls Woman	91/287 (31.4)	-
Controls European-derived	234/290 (80.7)	-
Age controls	264	44.2 ± 8.4
SLE Woman	336/365 (92.1)	-
SLE European-derived	276/364 (75.8)	-
Age SLE	365	45.9 ± 14.5
Age SLE diagnosis	364	32.5 ± 13.7
Malar Rash	200/365 (54.8)	-
Discoid Rash	53/365 (14.5)	-
Photosensitivity	276/365 (75.6)	-
Oral/ nasal ulcers	130/365 (35.6)	-
Arthritis	300/365 (82.2)	-
Serositis	114/364 (31.3)	-
Nephritis	158/365 (43.3)	-
Neurologic disorders	43/365 (11.8)	-
Hematologic disorders	284/365 (77.8)	-
Immunologic disorders	250/363 (68.9)	-
ANA	362/364 (99.5)	-
SLEDAI	314	1.0 ^b (0, 4.0) ^c

ANA, antinuclear antibody; SLEDAI, systemic lupus erythematosus disease activity index.

^aNumber of individuals with the feature/total analyzed.

^bMedian.

^cPercentiles 25, 75.

Table 2 *SIRT1* rs3758391 SNP and SLE clinical manifestations

rs3758391 genotype	TT	CT	CC	OR (95% CI)	<i>P</i> corr
	N (%)	N (%)	N (%)		
First SLEDAI					
Mean ± SD	3.87 ± 4.82	3.51 ± 4.99	1.92 ± 3.07		0.024^a
Mean Rank	172.42	170.30	137.26		0.006^{b,c}
Nephritis					
Yes	28 (17.8)	77 (49.0)	52 (33.1)	2.04 (1.32 - 3.14)^c	0.012
No	30 (14.6)	72 (35.1)	103 (50.2)		

^aKruskal-Wallis test^bMann-Whitney test^cTT and CT as risk genotypes

Table 3 *SIRT1* allelic, genotypic and haplotypic frequencies in patients and controls.

	Patients	Controls	<i>P</i>
	N (%)	N (%)	
Genotype rs12778366			
TT	290 (79.2)	220 (75.9)	0.558
CT	70 (19.1)	64 (22.1)	
CC	6 (1.6)	6 (2.1)	
Allele rs12778366			
T	650 (88.8)	504 (86.9)	0.287
C	82 (11.2)	76 (13.1)	
Genotype rs3758391			
TT	58 (15.9)	50 (17.4)	0.877
CT	149 (40.9)	115 (40.1)	
CC	157 (43.1)	122 (42.5)	
Allele rs3758391			
T	265 (36.4)	215 (37.46)	0.707
C	463 (63.6)	359 (62.54)	
Haplotype			
rs12778366/rs3758391			
T/T	93 (25.26)	71 (24.38)	0.75
C/T	41 (11.17)	38 (13.10)	
T/C	233 (63.57)	181 (62.52)	

4. Discussão

No presente estudo, foi investigado o papel dos polimorfismos rs12778366 e rs3758391 do promotor de *SIRT1* na susceptibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico e suas manifestações clínicas. O envolvimento da molécula SIRT1 em processos como a tolerância periférica, inflamação, apoptose e silenciamento transcricional indicam uma possível participação desta molécula na etiopatogênese do LES. Este foi o primeiro estudo de associação a analisar variantes genéticas do gene *SIRT1* no desenvolvimento de uma patologia autoimune.

Dentre os parâmetros clínicos avaliados dos pacientes, os resultados obtidos indicaram um possível papel para SIRT1 como uma molécula modificadora da doença. Inicialmente, foram observadas associações entre o polimorfismo rs12778366 e fotossensibilidade e entre o SNP rs3758391 e erupção discoide, nefrite, distúrbios imunológicos e SLEDAI. Após correções para múltiplas comparações, os dados apontam para um envolvimento de SIRT1 na atividade da doença e na manifestação clínica de nefrite. Pacientes portadores do alelo T do polimorfismo rs3758391 do gene *SIRT1* apresentaram um ranking médio de SLEDAI mais elevado em relação aos pacientes homocigotos para o alelo C (170,95 vs 137,26, $P_{corr}=0,006$). O efeito protetor deste SNP também já foi observado em outras condições além da severidade de lúpus. O genótipo CC foi descrito como mais frequente entre indivíduos com envelhecimento saudável (OR=3,04, $P=0,027$) (Zhang *et al.*, 2010c). Outro estudo demonstrou que heterocigotos, mas não homocigotos TT, apresentaram menor risco para mortalidade cardiovascular em indivíduos idosos (HR=0,77, $P=0,018$) (Kuningas *et al.*, 2007).

É possível que em situações fisiopatológicas variáveis, o polimorfismo rs3758391 possa afetar diferencialmente a expressão de SIRT1 e influir na sua atividade de acetilase sobre diversos substratos. A variante rs3758391 está contida em um sítio de ligação à p53 com localização próxima a uma sequência de ligação à HIC1 no promotor de *SIRT* (Naqvi *et al.*, 2011). O alelo T deste SNP se liga com maior afinidade à p53 e é menos susceptível à repressão induzida por HIC1 na condição de estresse nutricional, o que resulta em uma elevada expressão de SIRT1 quando comparada ao genótipo CC (Naqvi *et al.*, 2011). Visto que linfócitos T CD4+ de pacientes com LES ativo

apresentaram um aumento na expressão de SIRT1, hipoacetilação global e altos escores SLEDAI correlacionados com a hipoacetilação de H3 (Hu *et al.*, 2008), e que o tratamento com siRNA para SIRT1 em linfócitos T CD4+ de camundongos propensos a lúpus elevou os níveis de acetilação global de H3 e H4, reduziu os níveis de anticorpos anti-dsDNA e melhorou o dano renal (Hu *et al.*, 2009), pode-se especular que o alelo T, associado a maiores índices SLEDAI, possa implicar em uma maior expressão de SIRT1 em linfócitos T CD4+ de pacientes com LES, resultando em uma consequente hipoacetilação global de histonas H3 e H4, repressão transcricional e maior atividade da doença. Entretanto, em um estudo envolvendo um ensaio de gene repórter com luciferase, Rai e colaboradores não evidenciaram diferenças na expressão de *SIRT1* em relação aos genótipos do polimorfismo rs3758391 (Rai *et al.*, 2012). Portanto, uma análise funcional desta variante pode esclarecer a forma pela qual ela regula a expressão de SIRT1 no contexto inflamatório de lúpus e contribui para variação dos índices de SLEDAI.

Alternativamente, é possível que a maneira pela qual uma elevada expressão de SIRT1 esteja envolvida com maiores índices SLEDAI seja através da promoção de apoptose. SIRT1 é capaz de deacetilar e suprimir NF- κ B, permitindo maior sensibilização a apoptose por TNF- α em linfócitos T (Yeung *et al.*, 2004). Pacientes com LES possuem maiores níveis séricos de TNF- α (Aringer *et al.*, 2002) e seus linfócitos T são mais susceptíveis à apoptose na presença de TNF- α que controles saudáveis (Habib *et al.*, 2009). Desta forma, é possível que os maiores níveis de SIRT1 encontrados em linfócitos T CD4+ de pacientes estejam contribuindo para um aumento de células apoptóticas, com consequente liberação do conteúdo intracelular das mesmas, o que poderia facilitar a produção de autoanticorpos e elevar a atividade da patologia. A verificação deste possível mecanismo, assim como da influência do polimorfismo rs3758391 sobre a expressão diferencial de SIRT1, auxiliará a elucidação do papel desta proteína na morbidade associada ao LES.

Outra indicação da contribuição genética de *SIRT1* para o desfecho clínico de LES foi o maior risco de desenvolvimento de nefrite entre pacientes portadores do alelo T em relação aos pacientes homocigotos CC para o polimorfismo rs3758391 do promotor de *SIRT1* (OR=2,04, P_{corr} =0,012, 95% IC 1,32 – 3,13). A nefrite lúpica é uma manifestação clínica do LES cuja origem pode ser a deposição de imunocomplexos pré-formados no

soro e ligação de autoanticorpos a antígenos glomerulares *in situ*, resultando em intensa inflamação renal. Como mencionado anteriormente, existem evidências controversas sobre a participação deste polimorfismo na expressão de SIRT1 (Naqvi *et al.*, 2011; Rai *et al.*, 2012). Porém, é possível que esta variante polimórfica modifique a expressão de *SIRT1* na condição da patologia de LES de uma forma ainda não esclarecida, como através do aumento de SIRT1 em linfócitos T CD4+ de pacientes, participando da promoção de hipacetilação global de H3 e H4, aumento da produção de autoanticorpos e dano renal.

Além da participação de SIRT1 na função celular de linfócitos, esta enzima também possui importante influência na função renal, podendo ser resultante da sua capacidade de deacetilar substratos não-histonas. Já foi evidenciado que a expressão de SIRT1 exerce efeito protetor sobre os rins por suprimir a apoptose através da redução dos níveis de p53 acetilados (Fan *et al.*, 2013). A ativação de SIRT1 melhora a função renal geral, enquanto a deleção de uma cópia do gene *SIRT1* intensifica o dano renal em camundongos com dano renal agudo (Fan *et al.*, 2013). Adicionalmente, a expressão de SIRT1 atenua a apoptose dependente de ROS via deacetilação de p53 e a apoptose dependente de TGF- β 1 via deacetilação de Smad7 em células mesangiais do glomérulo (Kume *et al.*, 2006; Kume *et al.*, 2007). Visto que camundongos *knockout* para *SIRT1* exibem deposição de imunocomplexos e infiltração de linfócitos nos rins, pode-se especular que a presença de uma variante genética que resulte em baixos níveis de expressão de SIRT1 possa desencadear um fenótipo semelhante predispondo à nefrite.

Além da presente associação do alelo T do polimorfismo rs3758391 de *SIRT1* com nefrite, este mesmo alelo já foi associado a diabetes tipo 2 (OR=1,36, $P=0,022$) (Cruz *et al.*, 2010). Também foi demonstrado que o tratamento de camundongos diabéticos com resveratrol ativou a via de sinalização SIRT1-PGC-1 α e preveniu o desenvolvimento de nefropatia diabética (Kim *et al.*, 2013). Além disso, rins de ratos modelo para diabetes tipo 2 apresentam expressão reduzida de SIRT1, o que resulta em elevados níveis de acetilação de NF- κ B, com consequente expressão de genes pró-inflamatórios e inflamação renal (Kitada *et al.*, 2011). Outros estudos devem ser realizados a fim de esclarecer se este contexto também é encontrado em rins de pacientes com lúpus.

Através dos resultados e trabalhos citados até o momento, seria possível mencionar que a expressão de SIRT1 parece ter influências controversas na patologia de lúpus. Se por

um lado, a falta de SIRT1 em camundongos parece induzir uma síndrome semelhante a lúpus, como uma maior expressão desta molécula poderia estar implicada em maiores escores da atividade da doença? O que parece acontecer é que existe um balanço adequado para a expressão desta proteína. Níveis muito baixos ou nulos no organismo acabam sendo prejudiciais, da mesma forma que altos níveis de expressão de SIRT1 em determinados tecidos poderiam influenciar na capacidade desta enzima de regular outros substratos e processos, como NF- κ B e apoptose. Desta forma, apesar de muitos trabalhos indicarem que SIRT1 é capaz de exercer uma função anti-inflamatória através da deacetilação de AP-1 e NF- κ B, um aumento da sua expressão acima dos níveis considerados normais pode influir em outras rotas de sinalização, possivelmente resultando em desfechos que desencadeiem mais inflamação. Adicionalmente, cabe ressaltar que, como SIRT1 é expressa em uma grande variedade de tecidos, sua variável expressão poderá influenciar diferentes cascatas de sinalização de maneira alternativa em cada tecido, podendo resultar em distintos desfechos.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, os polimorfismos rs12778366 e rs3758391 do gene *SIRT1* não estão associados à susceptibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico, visto que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas frequências alélicas, genótípicas e haplotípicas entre pacientes e controles de Porto Alegre (rs12778366: $P_{alelo}=0,287$, $P_{genótipo}=0,558$; rs3758391: $P_{alelo}=0,877$, $P_{genótipo}=0,707$; $P_{haplótipo}=0,75$). Entretanto, deve-se salientar que talvez tais resultados estejam apenas refletindo que estas variantes genéticas não possuem um papel na predisposição genética a LES nesta população estudada e é possível que o efeito seja diferente em outras populações. Foi previamente descrito em um estudo com gene repórter que o alelo T do polimorfismo rs12778366 do gene *SIRT1* está associado a níveis mais altos de expressão em comparação ao alelo C (Rai *et al.*, 2012). A influência do SNP rs12778366 também foi investigada na predisposição a diversas patologias em estudos de associação, mas não foi observada associação entre esta variante genética e nefropatia diabética, transtorno depressivo maior, esquizofrenia, transtorno bipolar ou psicose induzida por metanfetamina (Kishi *et al.*, 2011a; Kishi *et al.*, 2011b; Kishi *et al.*; Kishi *et al.*, 2010; Maeda *et al.*, 2010). Já o papel do polimorfismo rs3758391 foi analisado no processo de envelhecimento por diferentes grupos de pesquisa, e resultados conflitantes foram encontrados a respeito de sua influência sobre a longevidade (Flachsbarth *et al.*,

2006; Kuningas *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010c). É relevante ressaltar que o polimorfismo rs12778366 estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg na população do presente estudo, mas as frequências genóticas do SNP rs3758391 desviaram daquelas esperadas pelo equilíbrio de HW, observando-se um excesso de homozigotos TT e CC em pacientes e controles. Os estudos de associação com o polimorfismo rs3758391, previamente mencionados, observaram frequências genóticas de acordo com o esperado para o equilíbrio de HW em populações holandesa, alemã e chinesa Han. O excesso de homozigotos encontrado na população do sul do Brasil poderia ser um indicativo de seleção disruptiva. Entretanto, este achado pode também resultar de um desequilíbrio de ligação entre esta variante genética e outro polimorfismo no gene *SIRT1*, visto que este SNP já foi descrito em desequilíbrio de ligação com outros polimorfismos (Flachsbart *et al.*, 2006; Kuningas *et al.*, 2007). Como ainda não existem outros estudos abordando a frequência destas variantes genéticas no Brasil, seria interessante avaliá-las em outras populações brasileiras a fim de verificar se o excesso de homozigotos TT e CC descrito também é encontrado em outras regiões.

Neste trabalho, foram também avaliadas as frequências de variantes raras polimórficas do promotor de *SIRT1*. É relevante salientar que 2 dos 364 pacientes estudados eram negativos para a presença de anticorpos antinucleares, manifestação clínica muito comum entre pacientes com lúpus. Destes dois pacientes, um apresentou genótipo heterozigoto para o polimorfismo rs143094735. Além disso, os dois pacientes heterozigotos para o polimorfismo rs143094735 possuíam a manifestação clínica de distúrbios neurológicos. Variantes raras podem exercer efeitos substanciais na susceptibilidade a uma característica fenotípica. Como ressaltado por Manolio e colaboradores, a identificação de variantes raras pode ter importância na elucidação de possíveis regiões funcionais do genoma e pode esclarecer uma parcela da etiologia de doenças complexas (Manolio *et al.*, 2009).

Em conclusão, os resultados apresentados indicam que, apesar de os polimorfismos rs3758391 e rs12778366 do promotor do gene *SIRT1* não parecerem ter influência sobre a susceptibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico, alelo T do polimorfismo rs3758391 foi evidenciado como fator de risco para uma maior atividade da doença e maior desenvolvimento de nefrite lúpica, indicando um papel para *SIRT1* como molécula

modificadora da doença. Não obstante, é importante que estudos funcionais sejam realizados a fim de elucidar o mecanismo pelo qual o polimorfismo rs3758391 de *SIRT1* afeta a morbidade associada ao lúpus, assim como outros estudos de associação envolvendo polimorfismos do gene *SIRT1* sejam realizados para um melhor esclarecimento sobre a influência genética desta molécula na predisposição ao LES.

5. Referências

- Abdelmohsen K, Pullmann R, Jr., Lal A, Kim HH, Galban S, Yang X, Blethrow JD, Walker M, Shubert J, Gillespie DA *et al.* (2007) Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell* 25:543-557.
- Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, Maechler P and Verdin E (2007) Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* 282:33583-33592.
- Al Arfaj AS, Chowdhary AR, Khalil N and Ali R (2007) Immunogenicity of singlet oxygen modified human DNA: implications for anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 124:83-89.
- Alarcon-Segovia D, Alarcon-Riquelme ME, Cardiel MH, Caeiro F, Massardo L, Villa AR and Pons-Estel BA (2005) Familial aggregation of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other autoimmune diseases in 1,177 lupus patients from the GLADEL cohort. *Arthritis Rheum* 52:1138-1147.
- Alarcon GS, McGwin G, Jr., Petri M, Reveille JD, Ramsey-Goldman R and Kimberly RP (2002) Baseline characteristics of a multiethnic lupus cohort: PROFILE. *Lupus* 11:95-101.
- Alexander NJ, Smythe NL and Jokinen MP (1987) The type of dietary fat affects the severity of autoimmune disease in NZB/NZW mice. *Am J Pathol* 127:106-121.
- Alonso MD, Llorca J, Martinez-Vazquez F, Miranda-Filloo JA, Diaz de Teran T, Dierssen T, Vazquez-Rodriguez TR, Gomez-Acebo I, Blanco R and Gonzalez-Gay MA (2011) Systemic lupus erythematosus in northwestern Spain: a 20-year epidemiologic study. *Medicine (Baltimore)* 90:350-358.
- Aringer M, Feierl E, Steiner G, Stummvoll GH, Hofler E, Steiner CW, Radda I, Smole JS and Graninger WB (2002) Increased bioactive TNF in human systemic lupus erythematosus: associations with cell death. *Lupus* 11:102-108.
- Arunachalam G, Yao H, Sundar IK, Caito S and Rahman I (2010) SIRT1 regulates oxidant- and cigarette smoke-induced eNOS acetylation in endothelial cells: Role of resveratrol. *Biochem Biophys Res Commun* 393:66-72.
- Avalos JL, Bever KM and Wolberger C (2005) Mechanism of sirtuin inhibition by nicotinamide: altering the NAD(+) cosubstrate specificity of a Sir2 enzyme. *Mol Cell* 17:855-868.
- Back JH, Rezvani HR, Zhu Y, Guyonnet-Duperat V, Athar M, Ratner D and Kim AL (2011) Cancer cell survival following DNA damage-mediated premature senescence is regulated by mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent inhibition of sirtuin 1. *J Biol Chem* 286:19100-19108.
- Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, Shark KB, Grande WJ, Hughes KM, Kapur V *et al.* (2003) Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2610-2615.
- Bai P, Canto C, Brunyanszki A, Huber A, Szanto M, Cen Y, Yamamoto H, Houten SM, Kiss B, Oudart H *et al.* (2011) PARP-2 regulates SIRT1 expression and whole-body energy expenditure. *Cell Metab* 13:450-460.
- Ballestar E (2011) Epigenetic alterations in autoimmune rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 7:263-271.
- Balluz L, Philen R, Ortega L, Rosales C, Brock J, Barr D and Kieszak S (2001) Investigation of systemic lupus erythematosus in Nogales, Arizona. *Am J Epidemiol* 154:1029-1036.

- Banks AS, Kon N, Knight C, Matsumoto M, Gutierrez-Juarez R, Rossetti L, Gu W and Accili D (2008) SirT1 gain of function increases energy efficiency and prevents diabetes in mice. *Cell Metab* 8:333-341.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K *et al.* (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444:337-342.
- Beier UH, Wang L, Bhatti TR, Liu Y, Han R, Ge G and Hancock WW (2011) Sirtuin-1 targeting promotes Foxp3⁺ T-regulatory cell function and prolongs allograft survival. *Mol Cell Biol* 31:1022-1029.
- Bengtsson AA, Sturfelt G, Truedsson L, Blomberg J, Alm G, Vallin H and Ronnblom L (2000) Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. *Lupus* 9:664-671.
- Bernatsky S, Boivin JF, Joseph L, Manzi S, Ginzler E, Gladman DD, Urowitz M, Fortin PR, Petri M, Barr S *et al.* (2006) Mortality in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54:2550-2557.
- Bernatsky S, Boivin JF, Joseph L, Rajan R, Zoma A, Manzi S, Ginzler E, Urowitz M, Gladman D, Fortin PR *et al.* (2005) An international cohort study of cancer in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52:1481-1490.
- Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V and Banchereau J (2001) Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 294:1540-1543.
- Blanco P, Pitard V, Viallard JF, Taupin JL, Pellegrin JL and Moreau JF (2005) Increase in activated CD8⁺ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52:201-211.
- Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D and Chang CH (1992) Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 35:630-640.
- Bootsma H, Spronk P, Derksen R, de Boer G, Wolters-Dicke H, Hermans J, Limburg P, Gmelig-Meyling F, Kater L and Kallenberg C (1995) Prevention of relapses in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 345:1595-1599.
- Bordone L, Cohen D, Robinson A, Motta MC, van Veen E, Czopik A, Steele AD, Crowe H, Marmor S, Luo J *et al.* (2007) SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell* 6:759-767.
- Borges L and Cosman D (2000) LIRs/ILTs/MIRs, inhibitory and stimulatory Ig-superfamily receptors expressed in myeloid and lymphoid cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:209-217.
- Borra MT, Smith BC and Denu JM (2005) Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem* 280:17187-17195.
- Bosch-Presegue L and Vaquero A (2011) The dual role of sirtuins in cancer. *Genes Cancer* 2:648-662.
- Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, Bunce CM, White DA, Drayson MT, Craddock C and Turner BM (2005) Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia* 19:1751-1759.
- Brandt K, Bulfone-Paus S, Foster DC and Ruckert R (2003) Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood* 102:4090-4098.

- Bruce IN and Laskin CA (1997) Sex hormones in systemic lupus erythematosus: a controversy for modern times. *J Rheumatol* 24:1461-1463.
- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY *et al.* (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303:2011-2015.
- Canto C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakci C, Coste A, Lagouge M, Zierath JR and Auwerx J (2010) Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab* 11:213-219.
- Carafa V, Nebbioso A and Altucci L (2012) Sirtuins and disease: the road ahead. *Front Pharmacol* 3:4.
- Casciola-Rosen L and Rosen A (1997) Ultraviolet light-induced keratinocyte apoptosis: a potential mechanism for the induction of skin lesions and autoantibody production in LE. *Lupus* 6:175-180.
- Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Domenech I, Aydintug AO, Jedryka-Goral A, de Ramon E *et al.* (1993) 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)* 72:113-124.
- Chen D, Bruno J, Easlon E, Lin SJ, Cheng HL, Alt FW and Guarente L (2008) Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes Dev* 22:1753-1757.
- Chen LF and Greene WC (2003) Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation. *J Mol Med (Berl)* 81:549-557.
- Chen WY, Wang DH, Yen RC, Luo J, Gu W and Baylin SB (2005) Tumor suppressor HIC1 directly regulates SIRT1 to modulate p53-dependent DNA-damage responses. *Cell* 123:437-448.
- Cohen HY, Miller C, Bitterman KJ, Wall NR, Hekking B, Kessler B, Howitz KT, Gorospe M, de Cabo R and Sinclair DA (2004) Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* 305:390-392.
- Cohen S, Dadi H, Shaoul E, Sharfe N and Roifman CM (1999) Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. *Blood* 93:2013-2024.
- Consiglio CR, Veit TD, Monticeli OA, Mucenic T, Xavier RM, Brenol JC and Chies JA (2011) Association of the HLA-G gene +3142C>G polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 77:540-545.
- Cooper GS, Makris SL, Nietert PJ and Jinot J (2009) Evidence of autoimmune-related effects of trichloroethylene exposure from studies in mice and humans. *Environ Health Perspect* 117:696-702.
- Costa Cdos S, Hammes TO, Rohden F, Margis R, Bortolotto JW, Padoin AV, Mottin CC and Guaragna RM (2010) SIRT1 transcription is decreased in visceral adipose tissue of morbidly obese patients with severe hepatic steatosis. *Obes Surg* 20:633-639.
- Costenbader KH, Feskanich D, Stampfer MJ and Karlson EW (2007) Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum* 56:1251-1262.
- Crispin JC, Kytтары VC, Juang YT and Tsokos GC (2008a) How signaling and gene transcription aberrations dictate the systemic lupus erythematosus T cell phenotype. *Trends Immunol* 29:110-115.

- Crispin JC, Liossis SN, Kis-Toth K, Lieberman LA, Kyttaris VC, Juang YT and Tsokos GC (2010) Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med* 16:47-57.
- Crispin JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, Kyttaris VC, Juang YT and Tsokos GC (2008b) Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J Immunol* 181:8761-8766.
- Crispin JC, Vargas MI and Alcocer-Varela J (2004) Immunoregulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 3:45-51.
- Cruz M, Valladares-Salgado A, Garcia-Mena J, Ross K, Edwards M, Angeles-Martinez J, Ortega-Camarillo C, de la Pena JE, Burguete-Garcia AI, Wachter-Rodarte N *et al.* (2010) Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City. *Diabetes Metab Res Rev* 26:261-270.
- Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, Walker A and Mack TM (1992) A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 35:311-318.
- Decker P, Singh-Jasuja H, Haager S, Kotter I and Rammensee HG (2005) Nucleosome, the main autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation. *J Immunol* 174:3326-3334.
- Deng Y and Tsao BP (2010) Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol* 6:683-692.
- Dieker JW, Fransen JH, van Bavel CC, Briand JP, Jacobs CW, Muller S, Berden JH and van der Vlag J (2007) Apoptosis-induced acetylation of histones is pathogenic in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 56:1921-1933.
- Dijstelbloem HM, Bijl M, Fijnheer R, Scheepers RH, Oost WW, Jansen MD, Sluiter WJ, Limburg PC, Derksen RH, van de Winkel JG *et al.* (2000) Fcγ receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes. *Arthritis Rheum* 43:2793-2800.
- Ding D, Mehta H, McCune WJ and Kaplan MJ (2006) Aberrant phenotype and function of myeloid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 177:5878-5889.
- Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC, Ranchin B, Fabien N, Cochat P, Pouteil-Noble C, Trolliet P *et al.* (2009) Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol* 10:778-785.
- Emlen W, Niebur J and Kadera R (1994) Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 152:3685-3692.
- Fadini GP, Ceolotto G, Pagnin E, de Kreutzenberg S and Avogaro A (2011) At the crossroads of longevity and metabolism: the metabolic syndrome and lifespan determinant pathways. *Aging Cell* 10:10-17.
- Fan H, Yang HC, You L, Wang YY, He WJ and Hao CM (2013) The histone deacetylase, SIRT1, contributes to the resistance of young mice to ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Kidney Int.*
- Feige JN and Auwerx J (2007) Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. *Trends Cell Biol* 17:292-301.

- Finkel T, Deng CX and Mostoslavsky R (2009) Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* 460:587-591.
- Finley LW and Haigis MC (2009) The coordination of nuclear and mitochondrial communication during aging and calorie restriction. *Ageing Res Rev* 8:173-188.
- Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J and Singh S (2008) Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:3-19.
- Flachsbart F, Croucher PJ, Nikolaus S, Hampe J, Cordes C, Schreiber S and Nebel A (2006) Sirtuin 1 (SIRT1) sequence variation is not associated with exceptional human longevity. *Exp Gerontol* 41:98-102.
- Flick F and Luscher B (2012) Regulation of sirtuin function by posttranslational modifications. *Front Pharmacol* 3:29.
- Ford E, Voit R, Liszt G, Magin C, Grummt I and Guarente L (2006) Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev* 20:1075-1080.
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J *et al.* (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10604-10609.
- Frescas D, Valenti L and Accili D (2005) Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *J Biol Chem* 280:20589-20595.
- Furst DE, Clarke AE, Fernandes AW, Bancroft T, Greth W and Iorga S (2012) Incidence and prevalence of adult systemic lupus erythematosus in a large US managed care population. *Lupus*.
- Furukawa F, Kashihara-Sawami M, Lyons MB and Norris DA (1990) Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVL): implications for the pathogenesis of photosensitive cutaneous lupus. *J Invest Dermatol* 94:77-85.
- Gao B, Kong Q, Kemp K, Zhao YS and Fang D (2012) Analysis of sirtuin 1 expression reveals a molecular explanation of IL-2-mediated reversal of T-cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:899-904.
- Garcia BA, Busby SA, Shabanowitz J, Hunt DF and Mishra N (2005) Resetting the epigenetic histone code in the MRL-lpr/lpr mouse model of lupus by histone deacetylase inhibition. *J Proteome Res* 4:2032-2042.
- Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, Alt FW, Wu Z and Puigserver P (2007) Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *EMBO J* 26:1913-1923.
- Ghosh HS, Spencer JV, Ng B, McBurney MW and Robbins PD (2007) Sirt1 interacts with transducin-like enhancer of split-1 to inhibit nuclear factor kappaB-mediated transcription. *Biochem J* 408:105-111.
- Goldberg MA, Arnett FC, Bias WB and Shulman LE (1976) Histocompatibility antigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 19:129-132.
- Goodridge JP, Lathbury LJ, Steiner NK, Shulse CN, Pullikotil P, Seidah NG, Hurley CK, Christiansen FT and Witt CS (2007) Three common alleles of KIR2DL4 (CD158d) encode constitutively expressed, inducible and secreted receptors in NK cells. *Eur J Immunol* 37:199-211.
- Gregersen PK and Olsson LM (2009) Recent advances in the genetics of autoimmune disease. *Annu Rev Immunol* 27:363-391.

- Griffin JM, Blossom SJ, Jackson SK, Gilbert KM and Pumford NR (2000) Trichloroethylene accelerates an autoimmune response by Th1 T cell activation in MRL +/+ mice. *Immunopharmacology* 46:123-137.
- Grondal G, Gunnarsson I, Ronnelid J, Rogberg S, Klareskog L and Lundberg I (2000) Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 18:565-570.
- Guo X, Williams JG, Schug TT and Li X (2010) DYRK1A and DYRK3 promote cell survival through phosphorylation and activation of SIRT1. *J Biol Chem* 285:13223-13232.
- Habib HM, Taher TE, Isenberg DA and Mageed RA (2009) Enhanced propensity of T lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus to apoptosis in the presence of tumour necrosis factor alpha. *Scand J Rheumatol* 38:112-120.
- Han L, Zhou R, Niu J, McNutt MA, Wang P and Tong T (2010) SIRT1 is regulated by a PPAR γ -SIRT1 negative feedback loop associated with senescence. *Nucleic Acids Res* 38:7458-7471.
- Han MK, Song EK, Guo Y, Ou X, Mantel C and Broxmeyer HE (2008) SIRT1 regulates apoptosis and Nanog expression in mouse embryonic stem cells by controlling p53 subcellular localization. *Cell Stem Cell* 2:241-251.
- Harbige LS (2003) Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. *Lipids* 38:323-341.
- Harting K and Knoll B (2010) SIRT2-mediated protein deacetylation: An emerging key regulator in brain physiology and pathology. *Eur J Cell Biol* 89:262-269.
- Hassan SZ, Gheita TA, Kenawy SA, Fahim AT, El-Sorougy IM and Abdou MS (2011) Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: relationship to disease manifestations and activity. *Int J Rheum Dis* 14:325-331.
- Hayashida S, Arimoto A, Kuramoto Y, Kozako T, Honda S, Shimeno H and Soeda S (2010) Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD⁺-dependent protein deacetylase, via activation of PPAR α in mice. *Mol Cell Biochem* 339:285-292.
- Heltweg B, Gatbonton T, Schuler AD, Posakony J, Li H, Goehle S, Kollipara R, Depinho RA, Gu Y, Simon JA *et al.* (2006) Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes. *Cancer Res* 66:4368-4377.
- Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB and Kalden JR (1998) Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41:1241-1250.
- Herrmann M, Winkler T, Gaipf U, Lorenz H, Geiler T and Kalden JR (2000) Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Immunol* 123:28-35.
- Hida Y, Kubo Y, Murao K and Arase S (2007) Strong expression of a longevity-related protein, SIRT1, in Bowen's disease. *Arch Dermatol Res* 299:103-106.
- Hisahara S, Chiba S, Matsumoto H, Tanno M, Yagi H, Shimohama S, Sato M and Horio Y (2008) Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:15599-15604.
- Hochberg MC (1987) Prevalence of systemic lupus erythematosus in England and Wales, 1981-2. *Ann Rheum Dis* 46:664-666.
- Hochberg MC (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40:1725.

- Hokari F, Kawasaki E, Sakai A, Koshinaka K, Sakuma K and Kawanaka K (2010) Muscle contractile activity regulates Sirt3 protein expression in rat skeletal muscles. *J Appl Physiol* 109:332-340.
- Houtkooper RH, Pirinen E and Auwerx J (2012) Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:225-238.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL *et al.* (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425:191-196.
- Hu N, Long H, Zhao M, Yin H and Lu Q (2009) Aberrant expression pattern of histone acetylation modifiers and mitigation of lupus by SIRT1-siRNA in MRL/lpr mice. *Scand J Rheumatol* 38:464-471.
- Hu N, Qiu X, Luo Y, Yuan J, Li Y, Lei W, Zhang G, Zhou Y, Su Y and Lu Q (2008) Abnormal histone modification patterns in lupus CD4+ T cells. *J Rheumatol* 35:804-810.
- Huang JY, Hirschey MD, Shimazu T, Ho L and Verdin E (2010) Mitochondrial sirtuins. *Biochim Biophys Acta* 1804:1645-1651.
- Huffman DM, Grizzle WE, Bamman MM, Kim JS, Eltoum IA, Elgavish A and Nagy TR (2007) SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer Res* 67:6612-6618.
- Jacobi AM, Odendahl M, Reiter K, Bruns A, Burmester GR, Radbruch A, Valet G, Lipsky PE and Dorner T (2003) Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 48:1332-1342.
- James JA, Neas BR, Moser KL, Hall T, Bruner GR, Sestak AL and Harley JB (2001) Systemic lupus erythematosus in adults is associated with previous Epstein-Barr virus exposure. *Arthritis Rheum* 44:1122-1126.
- Jimenez S, Cervera R, Font J and Ingelmo M (2003) The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Clin Rev Allergy Immunol* 25:3-12.
- Jing E, Gesta S and Kahn CR (2007) SIRT2 regulates adipocyte differentiation through FoxO1 acetylation/deacetylation. *Cell Metab* 6:105-114.
- Jolly CA, Muthukumar A, Avula CP, Troyer D and Fernandes G (2001) Life span is prolonged in food-restricted autoimmune-prone (NZB x NZW)F(1) mice fed a diet enriched with (n-3) fatty acids. *J Nutr* 131:2753-2760.
- Jungers P, Nahoul K, Pelissier C, Dougados M, Tron F and Bach JF (1982) Low plasma androgens in women with active or quiescent systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:454-457.
- Kaeberlein M, McVey M and Guarente L (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13:2570-2580.
- Kahyo T, Ichikawa S, Hatanaka T, Yamada MK and Setou M (2008) A novel chalcone polyphenol inhibits the deacetylase activity of SIRT1 and cell growth in HEK293T cells. *J Pharmacol Sci* 108:364-371.
- Kanfi Y, Peshti V, Gil R, Naiman S, Nahum L, Levin E, Kronfeld-Schor N and Cohen HY (2010) SIRT6 protects against pathological damage caused by diet-induced obesity. *Aging Cell* 9:162-173.
- Kapoor RR, Flanagan SE, Fulton P, Chakrapani A, Chadeaux B, Ben-Omran T, Banerjee I, Shield JP, Ellard S and Hussain K (2009) Hyperinsulinism-hyperammonaemia

- syndrome: novel mutations in the *GLUD1* gene and genotype-phenotype correlations. *Eur J Endocrinol* 161:731-735.
- Kelly G (2010) A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 1. *Altern Med Rev* 15:245-263.
- Kim HJ, Kim JH, Noh S, Hur HJ, Sung MJ, Hwang JT, Park JH, Yang HJ, Kim MS, Kwon DY *et al.* (2011) Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. *J Proteome Res* 10:722-731.
- Kim MY, Lim JH, Youn HH, Hong YA, Yang KS, Park HS, Chung S, Koh SH, Shin SJ, Choi BS *et al.* (2013) Resveratrol prevents renal lipotoxicity and inhibits mesangial cell glucotoxicity in a manner dependent on the AMPK-SIRT1-PGC1 α axis in db/db mice. *Diabetologia* 56:204-217.
- Kishi T, Fukuo Y, Kitajima T, Okochi T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Inada T, Kunugi H, Kato T *et al.* (2011a) SIRT1 gene, schizophrenia and bipolar disorder in the Japanese population: an association study. *Genes Brain Behav* 10:257-263.
- Kishi T, Fukuo Y, Okochi T, Kitajima T, Ujike H, Inada T, Yamada M, Uchimura N, Sora I, Iyo M *et al.* (2011b) No significant association between SIRT1 gene and methamphetamine-induced psychosis in the Japanese population. *Hum Psychopharmacol* 26:445-450.
- Kishi T, Yoshimura R, Kitajima T, Okochi T, Okumura T, Tsunoka T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Fukuo Y *et al.* (2010) SIRT1 gene is associated with major depressive disorder in the Japanese population. *J Affect Disord* 126:167-173.
- Kishi T, Yoshimura R, Kitajima T, Okochi T, Okumura T, Tsunoka T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Fukuo Y *et al.* (2010) SIRT1 gene is associated with major depressive disorder in the Japanese population. *J Affect Disord* 126:167-173.
- Kiss E, Csipo I, Cohen JH, Reveil B, Kawai M and Szegedi G (1996) CR1 density polymorphism and expression on erythrocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 25:53-58.
- Kitada M, Takeda A, Nagai T, Ito H, Kanasaki K and Koya D (2011) Dietary restriction ameliorates diabetic nephropathy through anti-inflammatory effects and regulation of the autophagy via restoration of Sirt1 in diabetic Wistar fatty (fa/fa) rats: a model of type 2 diabetes. *Exp Diabetes Res* 2011:908185.
- Koltai E, Szabo Z, Atalay M, Boldogh I, Naito H, Goto S, Nyakas C and Radak Z (2010) Exercise alters SIRT1, SIRT6, NAD and NAMPT levels in skeletal muscle of aged rats. *Mech Ageing Dev* 131:21-28.
- Kong S, Kim SJ, Sandal B, Lee SM, Gao B, Zhang DD and Fang D (2011) The type III histone deacetylase Sirt1 protein suppresses p300-mediated histone H3 lysine 56 acetylation at Bclaf1 promoter to inhibit T cell activation. *J Biol Chem* 286:16967-16975.
- Kong S, McBurney MW and Fang D (2011) Sirtuin 1 in immune regulation and autoimmunity. *Immunol Cell Biol* 90:6-13.
- Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M and Kuchroo VK (2007) IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448:484-487.
- Kume S, Haneda M, Kanasaki K, Sugimoto T, Araki S, Isono M, Isshiki K, Uzu T, Kashiwagi A and Koya D (2006) Silent information regulator 2 (SIRT1) attenuates oxidative stress-induced mesangial cell apoptosis via p53 deacetylation. *Free Radic Biol Med* 40:2175-2182.

- Kume S, Haneda M, Kanasaki K, Sugimoto T, Araki S, Isshiki K, Isono M, Uzu T, Guarente L, Kashiwagi A *et al.* (2007) SIRT1 inhibits transforming growth factor beta-induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation. *J Biol Chem* 282:151-158.
- Kuningas M, Putters M, Westendorp RG, Slagboom PE and van Heemst D (2007) SIRT1 gene, age-related diseases, and mortality: the Leiden 85-plus study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62:960-965.
- Kurien BT and Scofield RH (2008) Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens. *Autoimmun Rev* 7:567-573.
- Kwon HS, Brent MM, Getachew R, Jayakumar P, Chen LF, Schnolzer M, McBurney MW, Marmorstein R, Greene WC and Ott M (2008) Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein inhibits the SIRT1 deacetylase and induces T cell hyperactivation. *Cell Host Microbe* 3:158-167.
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P *et al.* (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127:1109-1122.
- Lahita RG, Bradlow HL, Kunkel HG and Fishman J (1979) Alterations of estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 22:1195-1198.
- Lain S, Hollick JJ, Campbell J, Staples OD, Higgins M, Aoubala M, McCarthy A, Appleyard V, Murray KE, Baker L *et al.* (2008) Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator. *Cancer Cell* 13:454-463.
- Langley E, Pearson M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG and Kouzarides T (2002) Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* 21:2383-2396.
- Lara E, Mai A, Calvanese V, Altucci L, Lopez-Nieva P, Martinez-Chantar ML, Varela-Rey M, Rotili D, Nebbioso A, Ropero S *et al.* (2009) Salermide, a Sirtuin inhibitor with a strong cancer-specific proapoptotic effect. *Oncogene* 28:781-791.
- Lau CS, Yin G and Mok MY (2006) Ethnic and geographical differences in systemic lupus erythematosus: an overview. *Lupus* 15:715-719.
- Lee JH, Song MY, Song EK, Kim EK, Moon WS, Han MK, Park JW, Kwon KB and Park BH (2009) Overexpression of SIRT1 protects pancreatic beta-cells against cytokine toxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Diabetes* 58:344-351.
- Leonard WJ, Zeng R and Spolski R (2008) Interleukin 21: a cytokine/cytokine receptor system that has come of age. *J Leukoc Biol* 84:348-356.
- Lerang K, Gilboe I, Garen T, Thelle D and Gran J (2012) High incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus in Norway. *Lupus* 21:1362-1369.
- Li KJ, Wu CH, Hsieh SC, Lu MC, Tsai CY and Yu CL (2012) Deranged bioenergetics and defective redox capacity in T lymphocytes and neutrophils are related to cellular dysfunction and increased oxidative stress in patients with active systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol* 2012:548516.
- Li Y, Harada T, Juang YT, Kyttaris VC, Wang Y, Zidanic M, Tung K and Tsokos GC (2007) Phosphorylated ERM is responsible for increased T cell polarization, adhesion, and migration in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 178:1938-1947.

- Lieberman LA and Tsokos GC (2010) The IL-2 defect in systemic lupus erythematosus disease has an expansive effect on host immunity. *J Biomed Biotechnol* 2010:740619.
- Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T and Klinenberg JR (1991) Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. *J Immunol* 147:117-123.
- Liszt G, Ford E, Kurtev M and Guarente L (2005) Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem* 280:21313-21320.
- Liu T, Liu PY and Marshall GM (2009) The critical role of the class III histone deacetylase SIRT1 in cancer. *Cancer Res* 69:1702-1705.
- Llorente L, Richaud-Patin Y, Wijdenes J, Alcocer-Varela J, Maillot MC, Durand-Gasselini I, Fourrier BM, Galanaud P and Emilie D (1993) Spontaneous production of interleukin-10 by B lymphocytes and monocytes in systemic lupus erythematosus. *Eur Cytokine Netw* 4:421-427.
- Lopez-Pedraza C, Aguirre MA, Barbarroja N and Cuadrado MJ (2010) Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: role of proinflammatory cytokines and therapeutic approaches. *J Biomed Biotechnol* 2010.
- Lopez P, Mozo L, Gutierrez C and Suarez A (2003) Epidemiology of systemic lupus erythematosus in a northern Spanish population: gender and age influence on immunological features. *Lupus* 12:860-865.
- Love PE and Santoro SA (1990) Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 112:682-698.
- Lovgren T, Eloranta ML, Bave U, Alm GV and Ronnblom L (2004) Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG. *Arthritis Rheum* 50:1861-1872.
- Luo J, Li M, Tang Y, Laszkowska M, Roeder RG and Gu W (2004) Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2259-2264.
- Maeda S, Koya D, Araki S, Babazono T, Umezono T, Toyoda M, Kawai K, Imanishi M, Uzu T, Suzuki D *et al.* (2010) Association between single nucleotide polymorphisms within genes encoding sirtuin families and diabetic nephropathy in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Clin Exp Nephrol* 15:381-390.
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A *et al.* (2009) Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461:747-753.
- McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA, Jr., Ramsey-Goldman R, LaPorte RE and Kwok CK (1995) Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum* 38:1260-1270.
- McClain MT, Heinlen LD, Dennis GJ, Roebuck J, Harley JB and James JA (2005) Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nat Med* 11:85-89.
- McGuinness D, McGuinness DH, McCaul JA and Shiels PG (2011) Sirtuins, bioageing, and cancer. *J Aging Res* 2011:235754.
- McLoughlin RM, Jenkins BJ, Grail D, Williams AS, Fielding CA, Parker CR, Ernst M, Topley N and Jones SA (2005) IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9589-9594.

- Michan S, Li Y, Chou MM, Parrella E, Ge H, Long JM, Allard JS, Lewis K, Miller M, Xu W *et al.* (2010) SIRT1 is essential for normal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci* 30:9695-9707.
- Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC and Horikawa I (2005) Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* 16:4623-4635.
- Mishra N, Brown DR, Olorenshaw IM and Kammer GM (2001) Trichostatin A reverses skewed expression of CD154, interleukin-10, and interferon-gamma gene and protein expression in lupus T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2628-2633.
- Mishra N, Reilly CM, Brown DR, Ruiz P and Gilkeson GS (2003) Histone deacetylase inhibitors modulate renal disease in the MRL-lpr/lpr mouse. *J Clin Invest* 111:539-552.
- Mok CC and Lau CS (2000) Profile of sex hormones in male patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 9:252-257.
- Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii Y, Nakajima K and Kishimoto T (1988) The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med* 167:332-344.
- Muthukumar AR, Jolly CA, Zaman K and Fernandes G (2000) Calorie restriction decreases proinflammatory cytokines and polymeric Ig receptor expression in the submandibular glands of autoimmune prone (NZB x NZW)F1 mice. *J Clin Immunol* 20:354-361.
- Nagata S, Hanayama R and Kawane K (2010) Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 140:619-630.
- Nakashima CA, Galhardo AP, Silva JF, Fiorenzano GR, Santos AB, Leite MF, Nogueira MA, Menolli PV and Menolli RA (2011) Incidence and clinical-laboratory aspects of systemic lupus erythematosus in a Southern Brazilian city. *Rev Bras Reumatol* 51:231-239.
- Naqvi A, Hoffman TA, DeRicco J, Kumar A, Kim CS, Jung SB, Yamamori T, Kim YR, Mehdi F, Kumar S *et al.* (2011) A single-nucleotide variation in a p53-binding site affects nutrient-sensitive human SIRT1 expression. *Hum Mol Genet* 19:4123-4133.
- Nasrin N, Kaushik VK, Fortier E, Wall D, Pearson KJ, de Cabo R and Bordone L (2009) JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. *PLoS One* 4:e8414.
- Nemoto S, Fergusson MM and Finkel T (2004) Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* 306:2105-2108.
- Nie Y, Erion DM, Yuan Z, Dietrich M, Shulman GI, Horvath TL and Gao Q (2009) STAT3 inhibition of gluconeogenesis is downregulated by SirT1. *Nat Cell Biol* 11:492-500.
- Niederer F, Ospelt C, Brentano F, Hottiger MO, Gay RE, Gay S, Detmar M and Kyburz D (2011) SIRT1 overexpression in the rheumatoid arthritis synovium contributes to proinflammatory cytokine production and apoptosis resistance. *Ann Rheum Dis* 70:1866-1873.
- Noriega LG, Feige JN, Canto C, Yamamoto H, Yu J, Herman MA, Matakis C, Kahn BB and Auwerx J (2011) CREB and ChREBP oppositely regulate SIRT1 expression in response to energy availability. *EMBO Rep* 12:1069-1076.
- O'Hagan HM, Mohammad HP and Baylin SB (2008) Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island. *PLoS Genet* 4:e1000155.

- Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, Mostoslavsky R, Vann J, Park SK, Hartlerode A, Stegmuller J, Hafner A, Loerch P *et al.* (2008) SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* 135:907-918.
- Obermoser G and Pascual V (2011) The interferon-alpha signature of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 19:1012-1019.
- Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, Lipsky PE, Radbruch A and Dorner T (2000) Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 165:5970-5979.
- Ogura M, Nakamura Y, Tanaka D, Zhuang X, Fujita Y, Obara A, Hamasaki A, Hosokawa M and Inagaki N (2010) Overexpression of SIRT5 confirms its involvement in deacetylation and activation of carbamoyl phosphate synthetase 1. *Biochem Biophys Res Commun* 393:73-78.
- Okazaki M, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Tsugita M, Nakayama S, Kambayashi M, Hashimoto K and Terada Y (2010) PPARbeta/delta regulates the human SIRT1 gene transcription via Sp1. *Endocr J* 57:403-413.
- Olaharski AJ, Rine J, Marshall BL, Babiarez J, Zhang L, Verdin E and Smith MT (2005) The flavoring agent dihydrocoumarin reverses epigenetic silencing and inhibits sirtuin deacetylases. *PLoS Genet* 1:e77.
- Olbrot M, Rud J, Moss LG and Sharma A (2002) Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6737-6742.
- Orecchia A, Scarponi C, Di Felice F, Cesarini E, Avitabile S, Mai A, Mauro ML, Sirri V, Zambruno G, Albanesi C *et al.* (2011) Sirtinol treatment reduces inflammation in human dermal microvascular endothelial cells. *PLoS One* 6:e24307.
- Ota H, Akishita M, Eto M, Iijima K, Kaneki M and Ouchi Y (2007) Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 43:571-579.
- Pacholec M, Bleasdale JE, Chrnyk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS, Griffith D, Griffor M, Loulakis P, Pabst B *et al.* (2010) SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem* 285:8340-8351.
- Pallas M, Pizarro JG, Gutierrez-Cuesta J, Crespo-Biel N, Alvira D, Tajés M, Yeste-Velasco M, Folch J, Canudas AM, Sureda FX *et al.* (2008) Modulation of SIRT1 expression in different neurodegenerative models and human pathologies. *Neuroscience* 154:1388-1397.
- Pan HF, Leng RX, Wang C, Qin WZ, Chen LL, Zha ZQ, Tao JH and Ye DQ (2012) Association of TNF-alpha promoter-308 A/G polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Rheumatol Int.*
- Parks CG, Cooper GS, Nylander-French LA, Sanderson WT, Dement JM, Cohen PL, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS *et al.* (2002) Occupational exposure to crystalline silica and risk of systemic lupus erythematosus: a population-based, case-control study in the southeastern United States. *Arthritis Rheum* 46:1840-1850.
- Perniok A, Wedekind F, Herrmann M, Specker C and Schneider M (1998) High levels of circulating early apoptotic peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 7:113-118.

- Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW and Guarente L (2004) Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429:771-776.
- Qiao L and Shao J (2006) SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *J Biol Chem* 281:39915-39924.
- Rai E, Sharma S, Kaul S, Jain K, Matharoo K, Bhanwer AS and Bamezai RN (2012) The interactive effect of SIRT1 promoter region polymorphism on type 2 diabetes susceptibility in the North Indian population. *PLoS One* 7:e48621.
- Rajendrasozhan S, Yang SR, Kinnula VL and Rahman I (2008) SIRT1, an antiinflammatory and antiaging protein, is decreased in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 177:861-870.
- Rane S, He M, Sayed D, Vashistha H, Malhotra A, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF and Abdellatif M (2009) Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ Res* 104:879-886.
- Reilly CM, Mishra N, Miller JM, Joshi D, Ruiz P, Richon VM, Marks PA and Gilkeson GS (2004) Modulation of renal disease in MRL/lpr mice by suberoylanilide hydroxamic acid. *J Immunol* 173:4171-4178.
- Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravalles EM, Friend D, Grusby MJ, Alt F and Glimcher LH (2001) Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 412:300-307.
- Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, de Bakker PI, Le JM, Lee HS, Batliwalla F *et al.* (2007) STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 357:977-986.
- Rhodes B and Vyse TJ (2008) The genetics of SLE: an update in the light of genome-wide association studies. *Rheumatology (Oxford)* 47:1603-1611.
- Rodgers JT, Lerin C, Gerhart-Hines Z and Puigserver P (2008) Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. *FEBS Lett* 582:46-53.
- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM and Puigserver P (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434:113-118.
- Rodgers JT and Puigserver P (2007) Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12861-12866.
- Rogina B and Helfand SL (2004) Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15998-16003.
- Sachs L, Lotem J and Shabo Y (1989) The molecular regulators of macrophage and granulocyte development. Role of MGI-2/IL-6. *Ann N Y Acad Sci* 557:417-435, discussion 435-417.
- Sasaki T, Maier B, Koclega KD, Chruszcz M, Gluba W, Stukenberg PT, Minor W and Scrabble H (2008) Phosphorylation regulates SIRT1 function. *PLoS One* 3:e4020.
- Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL and Boeke JD (2006) The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem* 75:435-465.
- Schuetz A, Min J, Antoshenko T, Wang CL, Allali-Hassani A, Dong A, Loppnau P, Vedadi M, Bochkarev A, Sternglanz R *et al.* (2007) Structural basis of inhibition of the human NAD⁺-dependent deacetylase SIRT5 by suramin. *Structure* 15:377-389.

- Schug TT, Xu Q, Gao H, Peres-da-Silva A, Draper DW, Fessler MB, Purushotham A and Li X (2010) Myeloid deletion of SIRT1 induces inflammatory signaling in response to environmental stress. *Mol Cell Biol* 30:4712-4721.
- Sequeira J, Boily G, Bazinet S, Saliba S, He X, Jardine K, Kennedy C, Staines W, Rousseaux C, Mueller R *et al.* (2008) sirt1-null mice develop an autoimmune-like condition. *Exp Cell Res* 314:3069-3074.
- Shah D, Aggarwal A, Bhatnagar A, Kiran R and Wanchu A (2011a) Association between T lymphocyte sub-sets apoptosis and peripheral blood mononuclear cells oxidative stress in systemic lupus erythematosus. *Free Radic Res* 45:559-567.
- Shah D, Kiran R, Wanchu A and Bhatnagar A (2010) Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to Th1 cytokine and disease activity. *Immunol Lett* 129:7-12.
- Shah D, Wanchu A and Bhatnagar A (2011b) Interaction between oxidative stress and chemokines: possible pathogenic role in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Immunobiology* 216:1010-1017.
- Shan T, Wang Y, Wu T, Liu C, Guo J, Zhang Y, Liu J and Xu Z (2009) Porcine sirtuin 1 gene clone, expression pattern, and regulation by resveratrol. *J Anim Sci* 87:895-904.
- Siegel M and Lee SL (1973) The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 3:1-54.
- Singh UP, Singh NP, Singh B, Hofseth LJ, Price RL, Nagarkatti M and Nagarkatti PS (2010) Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) induces silent mating type information regulation-1 and down-regulates nuclear transcription factor-kappaB activation to abrogate dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 332:829-839.
- Song JH, Yu JT, Liu M, Yan CZ and Tan L (2011a) Genetic association between ADAM10 gene polymorphism and Alzheimer's disease in a Northern Han Chinese population. *Brain Res* 1421:78-81.
- Song R, Xu W, Chen Y, Li Z, Zeng Y and Fu Y (2011b) The expression of Sirtuins 1 and 4 in peripheral blood leukocytes from patients with type 2 diabetes. *Eur J Histochem* 55:e10.
- Spolski R and Leonard WJ (2008) The Yin and Yang of interleukin-21 in allergy, autoimmunity and cancer. *Curr Opin Immunol* 20:295-301.
- Stahl-Hallengren C, Jonsen A, Nived O and Sturfelt G (2000) Incidence studies of systemic lupus erythematosus in Southern Sweden: increasing age, decreasing frequency of renal manifestations and good prognosis. *J Rheumatol* 27:685-691.
- Stoeger ZM, Chiorazzi N and Lahita RG (1988) Regulation of the immune response by sex hormones. I. In vitro effects of estradiol and testosterone on pokeweed mitogen-induced human B cell differentiation. *J Immunol* 141:91-98.
- Stohl W (1995) Impaired polyclonal T cell cytolytic activity. A possible risk factor for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 38:506-516.
- Stone NM, Williams A, Wilkinson JD and Bird G (2000) Systemic lupus erythematosus with C1q deficiency. *Br J Dermatol* 142:521-524.
- Studnicka-Benke A, Steiner G, Petera P and Smolen JS (1996) Tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors parallel clinical disease and autoimmune activity in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 35:1067-1074.

- Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, Rajamohan SB and Gupta MP (2008) SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70. *Mol Cell Biol* 28:6384-6401.
- Suzuki T, Suzuki N, Engleman EG, Mizushima Y and Sakane T (1995) Low serum levels of dehydroepiandrosterone may cause deficient IL-2 production by lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol* 99:251-255.
- Tackey E, Lipsky PE and Illei GG (2004) Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 13:339-343.
- Tang Y, Zhao W, Chen Y, Zhao Y and Gu W (2008) Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* 133:612-626.
- Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K and Horio Y (2007) Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem* 282:6823-6832.
- Taysi S, Gul M, Sari RA, Akcay F and Bakan N (2002) Serum oxidant/antioxidant status of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Chem Lab Med* 40:684-688.
- Tewthanom K, Janwityanuchit S, Totemchockchyakarn K and Panomvana D (2008) Correlation of lipid peroxidation and glutathione levels with severity of systemic lupus erythematosus: a pilot study from single center. *J Pharm Pharm Sci* 11:30-34.
- Tissenbaum HA and Guarente L (2001) Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410:227-230.
- Tsao BP (Editor), 2002 *Dubois' Lupus Erythematosus*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Urbonaviciute V, Furnrohr BG, Meister S, Munoz L, Heyder P, De Marchis F, Bianchi ME, Kirschning C, Wagner H, Manfredi AA *et al.* (2008) Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med* 205:3007-3018.
- Urbonaviciute V, Furnrohr BG, Weber C, Haslbeck M, Wilhelm S, Herrmann M and Voll RE (2007) Factors masking HMGB1 in human serum and plasma. *J Leukoc Biol* 81:67-74.
- van Bavel CC, Dieker J, Muller S, Briand JP, Monestier M, Berden JH and van der Vlag J (2009) Apoptosis-associated acetylation on histone H2B is an epitope for lupus autoantibodies. *Mol Immunol* 47:511-516.
- van Bruggen MC, Kramers C, Walgreen B, Elema JD, Kallenberg CG, van den Born J, Smeenk RJ, Assmann KJ, Muller S, Monestier M *et al.* (1997) Nucleosomes and histones are present in glomerular deposits in human lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 12:57-66.
- van Leeuwen I and Lain S (2009) Sirtuins and p53. *Adv Cancer Res* 102:171-195.
- van Loosdregt J, Vercoulen Y, Guichelaar T, Gent YY, Beekman JM, van Beekum O, Brenkman AB, Hijnen DJ, Mutis T, Kalkhoven E *et al.* (2010) Regulation of Treg functionality by acetylation-mediated Foxp3 protein stabilization. *Blood* 115:965-974.
- Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P and Reinberg D (2004) Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol Cell* 16:93-105.
- Vaquero A, Sternglanz R and Reinberg D (2007) NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene* 26:5505-5520.

- Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L and Weinberg RA (2001) hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107:149-159.
- Vedove CD, Del Giglio M, Schena D and Girolomoni G (2009) Drug-induced lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res* 301:99-105.
- Vilar MJ and Sato EI (2002) Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus* 11:528-532.
- Voelter-Mahlknecht S and Mahlknecht U (2006) Cloning, chromosomal characterization and mapping of the NAD-dependent histone deacetylases gene sirtuin 1. *Int J Mol Med* 17:59-67.
- Wakeland EK, Liu K, Graham RR and Behrens TW (2001) Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity* 15:397-408.
- Walport MJ (2001) Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 344:1140-1144.
- Wang F, Wang CL, Tan CT and Manivasagar M (1997) Systemic lupus erythematosus in Malaysia: a study of 539 patients and comparison of prevalence and disease expression in different racial and gender groups. *Lupus* 6:248-253.
- Wang FM, Chen YJ and Ouyang HJ (2011) Regulation of unfolded protein response modulator XBP1s by acetylation and deacetylation. *Biochem J* 433:245-252.
- Wang RH, Sengupta K, Li C, Kim HS, Cao L, Xiao C, Kim S, Xu X, Zheng Y, Chilton B *et al.* (2008) Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell* 14:312-323.
- Weyrich P, Machicao F, Reinhardt J, Machann J, Schick F, Tschratter O, Stefan N, Fritsche A and Haring HU (2008) SIRT1 genetic variants associate with the metabolic response of Caucasians to a controlled lifestyle intervention--the TULIP Study. *BMC Med Genet* 9:100.
- Wong CK, Wong PT, Tam LS, Li EK, Chen DP and Lam CW (2010) Elevated production of B cell chemokine CXCL13 is correlated with systemic lupus erythematosus disease activity. *J Clin Immunol* 30:45-52.
- Wu X, Kong X, Chen D, Li H, Zhao Y, Xia M, Fang M, Li P, Fang F, Sun L *et al.* (2011) SIRT1 links CIITA deacetylation to MHC II activation. *Nucleic Acids Res* 39:9549-9558.
- Yamakuchi M, Ferlito M and Lowenstein CJ (2008) miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:13421-13426.
- Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK and Hafler DA (2008) IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454:350-352.
- Yang SR, Wright J, Bauter M, Seweryniak K, Kode A and Rahman I (2007a) Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release via RelA/p65 NF-kappaB in macrophages in vitro and in rat lungs in vivo: implications for chronic inflammation and aging. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L567-576.
- Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS and Dong C (2007b) STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 282:9358-9363.
- Yang Y, Fu W, Chen J, Olashaw N, Zhang X, Nicosia SV, Bhalla K and Bai W (2007c) SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nat Cell Biol* 9:1253-1262.

- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA and Mayo MW (2004) Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J* 23:2369-2380.
- Yoshizaki T, Milne JC, Imamura T, Schenk S, Sonoda N, Babendure JL, Lu JC, Smith JJ, Jirousek MR and Olefsky JM (2009) SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. *Mol Cell Biol* 29:1363-1374.
- Ytterberg SR and Schnitzer TJ (1982) Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:401-406.
- Yu J and Auwerx J (2010) Protein deacetylation by SIRT1: an emerging key post-translational modification in metabolic regulation. *Pharmacol Res* 62:35-41.
- Yuan J, Pu M, Zhang Z and Lou Z (2009) Histone H3-K56 acetylation is important for genomic stability in mammals. *Cell Cycle* 8:1747-1753.
- Yun JM, Chien A, Jialal I and Devaraj S (2012) Resveratrol up-regulates SIRT1 and inhibits cellular oxidative stress in the diabetic milieu: mechanistic insights. *J Nutr Biochem* 23:699-705.
- Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V and Nussenzweig MC (2005) Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 201:703-711.
- Zeng L, Liu YP, Sha H, Chen H, Qi L and Smith JA (2010) XBP-1 couples endoplasmic reticulum stress to augmented IFN-beta induction via a cis-acting enhancer in macrophages. *J Immunol* 185:2324-2330.
- Zhang HN, Li L, Gao P, Chen HZ, Zhang R, Wei YS, Liu DP and Liang CC (2010a) Involvement of the p65/RelA subunit of NF-kappaB in TNF-alpha-induced SIRT1 expression in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 397:569-575.
- Zhang J, Lee SM, Shannon S, Gao B, Chen W, Chen A, Divekar R, McBurney MW, Braley-Mullen H, Zaghouani H *et al.* (2009) The type III histone deacetylase Sirt1 is essential for maintenance of T cell tolerance in mice. *J Clin Invest* 119:3048-3058.
- Zhang R, Chen HZ, Liu JJ, Jia YY, Zhang ZQ, Yang RF, Zhang Y, Xu J, Wei YS, Liu DP *et al.* (2010b) SIRT1 suppresses activator protein-1 transcriptional activity and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *J Biol Chem* 285:7097-7110.
- Zhang WG, Bai XJ and Chen XM (2010c) SIRT1 variants are associated with aging in a healthy Han Chinese population. *Clin Chim Acta* 411:1679-1683.
- Zhang Z, Song L, Maurer K, Petri MA and Sullivan KE (2010d) Global H4 acetylation analysis by ChIP-chip in systemic lupus erythematosus monocytes. *Genes Immun* 11:124-133.
- Zhu X, Liu Q, Wang M, Liang M, Yang X, Xu X, Zou H and Qiu J (2011) Activation of Sirt1 by resveratrol inhibits TNF-alpha induced inflammation in fibroblasts. *PLoS One* 6:e27081.