



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Laboratório de Imunogenética

TESE DE DOUTORADO

**O PAPEL DAS PROTEÍNAS APOPTÓTICAS NA
PATOGENESE DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO:
UMA ABORDAGEM IMUNOGENÉTICA**

Aluna de doutorado: Nadine Glesse

Orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Coorientadora: Dra. Priscila Vianna

Porto Alegre

Outubro de 2015

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

NADINE GLESSE

**O PAPEL DAS PROTEÍNAS APOPTÓTICAS NA PATOGÊNESE DO LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO: UMA ABORDAGEM IMUNOGENÉTICA**

Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Orientador

Dra. Priscila Vianna

Coorientadora

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

Porto Alegre

Outubro de 2015

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho contou com o apoio das seguintes agências e instituições:

AGÊNCIAS FINANCIADORAS

- CNPq
- CAPES
- FAPERGS
- FAURGS
- FIPE

INSTITUIÇÃO DE ORIGEM

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

INSTITUIÇÕES COLABORADORAS

- Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)
- Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)
- Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

MEUS AGRADECIMENTOS,

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus**, em quem eu encontro forças e persistência para seguir trilhando meu caminho e buscando meus objetivos e sonhos.

Ao **Prof. Dr. José Artur Bogo Chies** (o Zéca), por aceitar me orientar durante o período de oito anos, desde o trabalho de conclusão de curso até o doutorado, a quem tenho muito respeito e admiração e a quem muito devo o meu crescimento profissional e sabedoria adquiridos durante este tempo de pesquisa. Obrigada por acreditar e confiar em mim, por brigar quando achasse necessário e por ter me dado a oportunidade de trabalhar com esse grupo por tantos anos. Não vou esquecer das suas palavras: “Aprendemos todos os dias”.

À minha amiga e coorientadora **Pri Vianna**, que tornou a execução deste trabalho possível, por ter me apresentado esse mundo tão fascinante da imunologia celular, por todo o suporte com a citometria de fluxo, inclusive pelos dias de citometria (grávida) até tarde no lab. Obrigada pelo suporte emocional, que foi indispensável durante essa fase tão difícil.

À **Catarina Addobbati**, colaboradora do Recife e amiga, por toda a ajuda no processo de coletas dos pacientes e dos controles, pelo suporte com a metodologia de expressão gênica e pelos momentos bons que vivemos juntas.

Ao **PPGBM**, em especial ao Elmo, um exemplo de pessoa e profissional, que nunca mede esforços para nos auxiliar e que sempre dá um jeito de resolver o que parece não ter solução. Muita admiração por você e pelo seu trabalho!

Ao **CNPq**, pela bolsa de doutorado e pelo suporte financeiro, essenciais na execução desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Odirlei Monticielo**, um exemplo de profissional, pelo qual tenho muita admiração. Um dos poucos médicos que conheço que se dedica à pesquisa com tanto entusiasmo e quem fez com que esse trabalho saísse do papel, tornando as coletas dos pacientes, além de possível, menos burocrática e difícil. Obrigada pela ajuda e pelas palavras de incentivo sempre!

A todos os acadêmicos da medicina e aos demais profissionais do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo auxílio nas terças-

feiras de ambulatório; especialmente à **Renata Livi Ramos**, aluna que me auxiliou muito na seleção dos pacientes com Lúpus.

Ao pessoal do **Laboratório de Imunogenética**, pelo auxílio, amizade, “happy hours”, companheirismo e por sempre que eu precisei, poder ter contado com a ajuda de vocês. Vocês são nota 10! Foi um prazer trabalhar com todos e fazer parte desde grupo! Faço um agradecimento especial às colegas que se tornaram verdadeiras amigas:

À **Ana Karine**, pessoa e amiga muito especial, que me ajudou demais, tanto na bancada, quanto fora do laboratório. Dividimos alegrias, angústias, choros, cafés, lamúrias, trufas, almoços no RU... Vivemos tantas coisas inesquecíveis durante estes quatro anos e espero levar a nossa amizade daqui de dentro do lab para toda a vida!

À **Eriza**, amiga que fiz no laboratório. Obrigada por tantos momentos bons que vivemos juntas. Levo você no coração, sempre!

À **Maria**, que me auxiliou na bancada, na reta final do doutorado. Obrigada por vir até aos sábados trabalhar comigo! Você é uma pessoa muito dedicada, um exemplo de pesquisadora. Foi um prazer trabalhar com você!

À **Jacque, Fran, Gio, Rafa, Lian e Tiago**... Pessoas sem iguais, profissionais competentes que admiro muito. Obrigada pela convivência, ajuda e amizade! Vocês foram e são sensacionais!

Às minhas ICs, **Thais Lopes e Pâmela Palhano**, pela ajuda na bancada e por me darem a oportunidade de ensinar e orientar. Em especial, à minha primeira IC, que virou amiga e parceira de corridas, **Lia Paim**. Obrigada pela ajuda, desde a bancada, até ao apoio emocional, regado à pizza e vinho! Tenho certeza que cultivaremos nossa amizade para toda a vida! Obrigada por tudo, especialmente nos últimos meses, que foram desafiadores!

À minha amiga, **Gabi K. da Silva**, que caminha ao meu lado desde que me conheço por gente. Embora distantes fisicamente, sempre esteve por perto dando força, suporte, amizade e tudo o que eu precisasse! Obrigada por tudo, amiga! Tenho grande admiração por você! Sempre foi e é um exemplo de pessoa e profissional para mim!

Ao **Augusto**, pela força, apoio, carinho, amor... Por enfrentar comigo estes quatro anos e, especialmente, por ter tido tanta paciência no último ano, que foi um grande desafio para nós dois! Obrigada por tantas vezes entender a minha ausência e a minha distância! É uma parte de mim, obrigada por tudo!

Às minhas amigas de Santa Cruz do Sul, **Rosana, Daniele e Vanessa**, por compreenderem a minha ausência em tantos e tantos momentos, principalmente nestes últimos meses. Saber que mesmo distantes estamos sempre próximas é um conforto para o coração! Obrigada por serem amigas tão especiais e compreensivas. Amo vocês!

Ao pessoal do **Clube da Endorfina**, que me ajuda a manter a serenidade e sanidade mental. Graças a eles eu não enlouqueci no doutorado! Obrigada pela parceria nos treinos de corrida durante estes dois anos que estou no clube, pela emoção de enfrentarmos juntos o recente desafio da Maratona, que foi sensacional! Vocês são uma segunda família pra mim!

Aos meus novos colegas de trabalho, **Tatiane, Leonardo, Lila e Diego**, em especial à Tati, pelas palavras de conforto quando o desespero bateu na véspera de entregar a tese!

Aos meus pais, **Carmen e Clóvis**, e aos meus irmãos, **Caroline e Gustavo**, quem eu tanto amo! Estes sim, eu tenho que agradecer de todo coração, pela compreensão e paciência! Ao mano, por sempre me ajudar com os programas e softwares! Sem questionar, eles aceitaram a minha ausência e nunca deixaram de me incentivar nessa caminhada. Agradeço por terem me dado a oportunidade de vir para Porto Alegre fazer graduação. Hoje, se estou aqui e sou o que sou, é graças aos meus pais! Dedico este trabalho a vocês!

À minha tia **Ninha** e tio **Chico**, que desde julho me acolheram com tanto amor e carinho no seu lar. Não fosse por vocês, a finalização deste trabalho não teria sido possível. Do fundo do coração, muito obrigada a vocês que me acompanharam de tão pertinho e deram a base que eu precisava para terminar a tese!

A toda família que, de alguma forma, me ajudaram e incentivaram a seguir em frente nesta longa e desafiadora jornada!

MUITO OBRIGADA!!!

“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se transformam em golpes fatais. Mas se você tiver grandes sonhos... Seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão oportunidade, seus medos produzirão coragem. Por isso meu ardente desejo é que você NUNCA DESISTA DOS SEUS SONHOS”.

Augusto Cury

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	17
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	20
1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES).....	20
1.2 Características clínicas.....	21
1.3 Epidemiologia.....	24
1.4 Etiologia.....	26
1.4.1 Sistema Imunológico.....	27
1.4.2 Fatores Ambientais e Ocupacionais	30
1.4.3. Fatores Hormonais e Reprodutivos	32
1.4.4 Base Genética.....	34
1.5 Células T regulatórias (Treg) e o LES	40
1.6 Apoptose	43
1.6.1 Sistema Fas/FasL.....	47
1.6.2 Proteínas da família Bcl-2	49
1.6.3 Proteína p53.....	51
CAPÍTULO 2 - JUSTIFICATIVAS.....	55
CAPÍTULO 3 - OBJETIVOS.....	57
CAPÍTULO 4 - ARTIGO 1	59
Evaluation of polymorphic variants in apoptotic genes and their role in susceptibility and clinical progression to Systemic Lupus Erythematosus in southern Brazilian patients ..	59
CAPÍTULO 5 - ARTIGO 2	86
The influence of abnormal apoptosis of T cells subpopulations in the pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus	86

CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO	125
REFERÊNCIAS	139
ANEXOS	154
ANEXO I	154
CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	154
ANEXO II	156
PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DO AMBULATÓRIO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	156
ANEXO III	157
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTES	157
ANEXO IV	159
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLES	159
ANEXO V	161
QUESTIONÁRIO PARA AVALIAÇÃO DO GRUPO CONTROLE	161

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACR – Colégio Americano de Reumatologia/*American College of Rheumatology*
- ANA – Anticorpo antinuclear
- Anti-La/SSB – Anticorpo contra a ribonucleoproteína La (SSB) associada ao RNA
- Anti-RNP – Anticorpo contra ribonucleoproteína
- Anti-Ro/SSA – Anticorpo contra o antígeno Ro (SSA) (proteína pequena ligada ao RNA)
- Anti-Scl 70 – Anticorpo anti-DNA topoisomerase I
- Anti-Sm (Smith) – Anticorpo contra uma proteína nuclear ácida
- Apaf-1 – Fator de ativação de apoptose 1
- APO-1 (Fas) – Antígeno de apoptose 1
- APS: *Secondary Antiphospholipid Syndrome*
- ATG5 – Proteína de autofagia 5
- BAK – Proteína proapoptótica de domínio BH3-*only* antagonista/exterminadora homóloga à Bcl-2
- BANK1 – Proteína de ancoragem de célula B com repetições de anquirina
- BAX – Proteína proapoptótica de domínio BH3-*only* X promotora de morte associada à Bcl-2
- BCL-2 – Proteína 2 de linfoma de célula B
- BCL-xL – Proteína antiapoptótica de linfoma de célula B extra grande
- BLK – Tirosina-quinase de linfócitos B
- BID - Proteína proapoptótica de domínio BH3-*only* agonista da morte celular
- bp – Pares de bases
- cDNA – DNA complementar
- CD – Grupo de diferenciação
- C/EBPbeta – Proteína beta intensificadora de ligação à CCAAT
- CYP – Citocromo P450
- DC – Célula dendrítica
- DHEA – Dehidroepiandrosterona
- DN – Duplo negativa
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- dsDNA - Ácido desoxirribonucleico dupla fita

EBNA-1 - Antígeno nuclear 1 do vírus Epstein-Barr
EBV – Vírus Epstein-Barr
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
Elk-1 - Proteína Elk-1 do domínio ets
ENA - Antígeno nuclear extraível
ETS1 – oncogene homólogo ao vírus da eritroblastose aviária v-ets 1
EULAR – Liga Européia contra as doenças reumáticas/*European League Against Rheumatism*
FAM167A - Membro A da família com similaridade de sequência 167
FDA - Administração de alimentos e medicamentos
FADD – Proteína FAS associada com domínio de morte
FAS – Proteína Fas
FASL – Proteína ligante de Fas
Fc – Fração constante (cristalizável)
GAPDH – Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GST – Glutathione S-Transferase
GWAS – Estudos de Associação do Genoma
HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HLA – Antígeno Leucocitário Humano
IFN – Interferon
Ig – Imunoglobulina
IKZF1 – proteína pertencente à família de proteínas IKAROS com dedos de zinco
IL – Interleucina
IRF5/7 – Fator regulatório 5/7 do Interferon
ITGAM – Integrina alfa M
JAK – Janus quinase
kDa – Kilo dálton
MBL – Proteína de Ligação à Manose
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
MOMP - Permeabilização da membrana mitocondrial externa
NF-κB – factor nuclear kappa B
NK – Célula *natural killer*

NL – Nefrite lúpica
nTreg – Célula T regulatória natural
OR – Razão de chances
PBMCs – Células mononucleares do sangue periférico
PBS – Solução salina
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PTPN22 – Proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 22
P53 - Proteína citoplasmática de massa molecular 53 kDa
RASGRP3 - proteína RAS liberadora de guanil
RFLP – Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
SC – Sistema complemento
sFas – Proteína Fas solúvel
sFasL – Proteína ligante de Fas solúvel
LES – Lúpus eritematoso sistêmico
SLEDAI – Índice de atividade do lúpus eritematoso sistêmico
SLICC – *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (damage index: o termo é utilizado para avaliar o índice de dano no lúpus eritematoso sistêmico).
SNP – Polimorfismo de um único nucleotídeo
Sp-1 – Proteína estimulatória 1
SRC – proteína quinase Src
STAT1 – Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1
STAT4 - Transdutor de sinal e ativador de transcrição 4
T CD4 – Linfócito CD4
T CD8 – Linfócito CD8
TCR – Receptor de célula T
TGF- β – Fator de crescimento tumoral beta
Th – Célula T *helper*
TNF – Fator de necrose tumoral
TNFR1 – Receptor do fator de necrose tumoral 1
TNPO3 – Proteína transportina 3
TP53 – Gene supressor tumoral p53

TREX1 – Exonuclease de reparo 3´- 5´ 1

Treg – Célula T regulatória ou linfócito T regulador

TYK2 - Tirosina quinase 2

UBE2L3 – Enzima conjugadora de ubiquitina E2 L3

UV – ultravioleta

VDRL – Teste laboratorial de pesquisa de doença venérea

7-AAD - 7-Amino-Actinomicina-D

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema mostrando os defeitos na tolerância imunológica em pacientes com LES.-----	29
Figura 2. Esquema mostrando um diagrama de um gene, com a localização de variantes funcionais associadas ao LES.-----	39
Figura 3. Principais vias e tipos celulares envolvidos no LES.-----	40
Figura 4. Homeostase e apoptose de células T regulatórias. -----	43
Figura 5. As duas principais vias apoptóticas em células de mamíferos.-----	45
Figura 6: Hipótese geral para a ocorrência do LES.-----	46

RESUMO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica autoimune que se caracteriza pela perturbação da homeostase imunológica. Envolve a indução e produção de autoanticorpos, bem como formação e deposição de complexos imunes, que conduzem a uma intensa resposta inflamatória e dano tecidual. Fatores imunológicos, ambientais, hormonais e genéticos podem estar implicados na patogênese da doença. A expressão alterada de genes e proteínas reguladores da apoptose em células T pode comprometer a tolerância imunológica e induzir autoantígenos responsáveis pelo desenvolvimento e perpetuação de condições autoimunes. Mas, pouco se sabe a respeito de como a expressão destas proteínas afeta o desenvolvimento e a função das células T. As células T regulatórias (Treg), uma subpopulação celular de importância para prevenir a autoimunidade, apresentam número e capacidade supressora alterados nos pacientes lúpicos. Buscando entender como anormalidades observadas nas vias apoptóticas contribuem para a autoimunidade, o presente estudo avaliou a frequência de apoptose inicial e morte celular de linfócitos nestes pacientes, a frequência de subtipos de células T expressando as proteínas envolvidas nas vias extrínseca e intrínseca da apoptose, como Fas, FasL, Bax, Bcl-2 e p53, além da expressão dos genes que as codificam. Analisou-se ainda a frequência de polimorfismos nos genes *FAS*, *FASL*, *BCL-2* e *BAX* em pacientes, comparando estes dados com o de controles, buscando possíveis associações com a predisposição à doença e com os dados clínicos. Foram estudados 427 pacientes com LES do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e 543 indivíduos saudáveis, como controles. Dados de 50 mulheres lúpicas mostraram maior frequência de células Treg, bem como maior densidade de expressão do fator de transcrição Foxp3 nestas células em relação a controles, embora não tenhamos observado diferenças estatísticas em relação à expressão de proteínas pró- e antiapoptóticas nesta subpopulação celular. Uma proporção aumentada de células T CD4⁺ expressando Fas e p53, e uma frequência reduzida expressando Bcl-2 foi encontrada nas pacientes, em relação aos controles. Esse último dado foi apoiado pela relação observada entre a menor frequência de T CD4⁺ expressando Bcl-2 e a atividade da doença, e pela expressão diminuída do gene *BCL-2* em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de mulheres lúpicas. Células T CD8⁺ expressando Bax e p53 também foram mais frequentes nas pacientes, ressaltando que células T CD8⁺p53⁺ foram mais numerosas nas pacientes com positividade para anticorpos

anti-DNA. Maior frequência de morte de linfócitos foi observada em mulheres lúpicas. Com relação ao estudo dos polimorfismos, variantes alélicas dos genes *FASL* e *BAX* possivelmente se relacionam com o desenvolvimento e proteção da doença, respectivamente. Em conclusão, nossos achados apontam que a expressão modificada de genes e proteínas em células TCD4⁺ e TCD8⁺, relacionada a uma maior taxa de apoptose, podem conduzir à desregulação das vias apoptóticas e levar à perda da tolerância periférica, favoráveis ao desenvolvimento do LES.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory autoimmune disease that is characterized by disruption of the immune homeostasis. It involves the induction and production of autoantibodies, as well as formation and deposition of immune complexes, leading to a severe inflammatory response and tissue damage. Immunological, environmental, hormonal and genetic factors may be implicated in the pathogenesis of the disease. The altered expression of genes and proteins regulating apoptosis on T cells may lead to breakdown of the immune tolerance and induce autoantigen responsible for the development and perpetuation of autoimmune conditions. Little information is known of how these proteins affect the development and function of T cells. Regulatory T cells (Treg), a cell subpopulation of importance to prevent the autoimmunity, exhibit changed number and suppressive capacity in SLE patients. Trying to understand how abnormalities observed in apoptotic pathways contribute to autoimmunity, the present study evaluated the frequency of initial apoptosis and cell death of lymphocytes in these patients, the frequency of T cell subsets expressing the proteins involved in the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis, such as Fas, FasL, Bax, Bcl-2 and p53, besides the expression of genes that encode them. We also examined the polymorphisms frequencies of *Fas*, *FasL*, *Bcl-2* and *Bax* genes in patients, comparing these data with controls, looking for possible associations with the predisposition to disease and the clinical data. 427 SLE patients from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and 543 healthy subjects, as controls were studied. Results from 50 SLE women showed a higher frequency of Treg cells as well as a higher density of Foxp3 expression in these cells compared to controls, although we have not observed statistical differences in relation to the expression of pro- and antiapoptotic proteins in this cell subpopulation. An increased proportion of CD4⁺ T cells expressing Fas and p53, and a reduced frequency expressing Bcl-2 were found in patients. The latter finding was supported by the negative relation found between the frequency of CD4⁺Bcl-2⁺ cells and the disease activity index and by the decreased expression of *BCL-2* gene in PBMCs of lupus women. CD8⁺ T cells expressing Bax and p53 were also more frequent in patients, noting that CD8⁺ T cells expressing p53 were more frequent in patients positive for anti-DNA antibodies. A higher frequency of death of lymphocytes was observed in SLE women. Regarding to polymorphisms analysis, allelic variants of *FasL* and *Bax* are

possibly relate to the development and protection of the disease, respectively. In conclusion, our findings indicate that the modified expression of genes and proteins in CD4⁺ and CD8⁺ T cells, related to an increased apoptosis, may lead to dysregulation of the apoptosis pathways and the loss of peripheral tolerance, favorable for SLE development.

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)

O LES é uma doença inflamatória crônica autoimune que acomete múltiplos órgãos e sistemas. A patogênese do LES é caracterizada por uma perturbação da homeostase imunológica, que envolve a ativação anormal de células T, células B e células apresentadoras de antígenos. Estas apresentam autoantígenos às células T anormais autorreativas que são ativadas e fornecem ajuda às células B. O resultado é a indução e produção de autoanticorpos não órgão-específicos, dirigidos especialmente contra antígenos nucleares, ativação do sistema complemento (SC) e a entrada de células inflamatórias em órgãos-alvo, podendo levar à destruição tecidual. O aumento da apoptose contribui para o excesso de restos celulares que não são processados apropriadamente por células e mediadores solúveis, o que conduz à formação de complexos imunes que se depositam nos tecidos, levando à intensa inflamação sistêmica e dano a múltiplos órgãos (Achour *et al.*, 2010; Kyttaris *et al.*, 2006; Monticielo *et al.*, 2008).

O sistema imunológico dos pacientes se mostra comprometido de uma maneira ampla e a desregulação de elementos individualmente conduz a um comportamento alterado do sistema como um todo (Crispin *et al.*, 2010).

O nome “lúpus” vem da palavra latina que quer dizer lobo e tem sido utilizado desde a época medieval para descrever uma ulceração eritematosa da face. A natureza sistêmica da doença foi reconhecida pela primeira vez por Kaposi e Hebra (1875), que descreveram o lúpus eritematoso discóide concomitante com sintomas como febre, perda de peso, anemia, nódulos subcutâneos, artrite e adenite de glândulas linfáticas e salivares. Eles notaram que havia o potencial para um desfecho fatal, frequentemente precedido do envolvimento de grandes órgãos com pleuropneumonia, uremia e coma (Hay, 1995).

O diagnóstico da doença pode ser demorado. Em geral, pacientes podem levar em média quatro anos consultando cerca de três médicos para receber o diagnóstico correto. Parte do problema é o fato das manifestações clínicas do LES apresentarem amplo espectro de variabilidade entre os pacientes, com sinais e sintomas evoluindo ao longo do tempo. Além disso, frequentemente os médicos não consideram lúpus no diagnóstico diferencial (Manzi, 2009).

1.2 Características clínicas

O LES é uma doença clinicamente heterogênea, e é, por definição, uma doença multissistêmica (Manson & Rahman, 2006). Diferentes pacientes exibem distintas combinações de sintomas e características laboratoriais (Ghodke-Puranik & Niewold, 2015), e a evolução costuma ser crônica, havendo períodos de exacerbação e remissão. A doença pode cursar com artrite, nefrite, vasculite, miosite, quadros neuropsiquiátricos, hiperatividade retículo-endotelial e pneumonite, entre outros. Critérios de classificação têm sido desenvolvidos em parte na tentativa de manter o grupo de pacientes tão homogêneo quanto possível para fins de pesquisa. Estes critérios, definidos pela *American College of Rheumatology* (ACR), foram propostos em 1982 e combinam sinais e sintomas clínicos com anormalidades detectadas em exames de sangue, como positividade para anticorpo antinuclear (ANA) ou trombocitopenia. Estes critérios foram revisados em 1997, a fim de refletir uma maior compreensão do papel dos anticorpos antifosfolípidos em pacientes com LES (Edworthy *et al.*, 1988; Hochberg, 1997; Manson & Rahman, 2006; Tan *et al.*, 1982). Os critérios do ACR buscam auxiliar os médicos nos cuidados primários e no estabelecimento de um diagnóstico mais confiável. Entretanto, levando-se em conta o fato de que a confirmação de um destes ou sua relevância exige frequentemente interpretação, eles são inevitavelmente controversos (Manzi, 2001).

Apesar de sua aceitação geral, há preocupações sobre a capacidade destes critérios de detectar a doença mais branda e incapacidade para classificar aqueles pacientes com nefrite lúpica (NL) comprovada por biópsia na ausência de outras manifestações clínicas, por exemplo. Portanto, o grupo SLICC (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics*) criou novos critérios de classificação, provenientes de 702 cenários de paciente avaliados por peritos na área, que resultaram em menos erros de classificação, maior sensibilidade e igual especificidade em comparação com os critérios do ACR (Petri *et al.*, 2012). Atualmente, ACR e EULAR (*European League Against Rheumatism*) começaram um esforço conjunto para criar critérios de classificação melhores, que também ajudem no diagnóstico da doença (Lim & Drenkard, 2015). Um indivíduo é diagnosticado com lúpus quando se associam achados clínicos e laboratoriais, sendo que o paciente deve apresentar, no mínimo, quatro critérios, incluindo um clínico e um imunológico, ou o paciente deve ter lúpus nefrite comprovado com biópsia na presença de anticorpos antinucleares ou anti-DNA dupla fita (Petri *et al.*, 2012). Embora seja raro, também é possível haver pacientes

com LES que não exibem quatro dos critérios, principalmente quando apresentam anticorpo específico da doença, como anti-DNA ou anti-Sm, e apenas uma das manifestações clínicas descritas (Borba *et al.*, 2008).

Entre as principais características clínicas do LES, pode-se citar o envolvimento de pele e mucosas (52%), febre e mal-estar (48%) e artrites e artralguas (44%) (Boey, 1998). Os pacientes com LES apresentam fadiga e sono insatisfatório, embora a relação do cansaço com a atividade da doença ainda permaneça controversa. Assim como fadiga, a perda de peso e febre também não são sintomas específicos da doença, mas são comuns no LES e impactam a qualidade de vida dos pacientes. A doença renal afeta cerca de 30% dos pacientes, e mantém-se como a mais perigosa complicação que põe em risco a vida. Os pacientes que irão desenvolver NL o fazem mais comumente nos primeiros anos de sua doença. Como o envolvimento renal é muitas vezes assintomático, particularmente no início da doença o exame de urina regular e o monitoramento da pressão arterial são cruciais. O envolvimento renal é caracterizado por proteinúria ($> 0,5$ g/24 horas), e/ou presença de células vermelhas na urina e, neste caso, o encaminhamento para a biópsia renal é sugerido. As classes I-V de NL descrevem lesões mesangiais (I, II), proliferativas (III, IV) ou membranosas (V) e cada biópsia pode ter característica de mais de uma classe da doença. As classes III e IV são subdivididas de acordo com a atividade ou cronicidade das anomalias observadas. Os achados da biópsia renal são utilizados para avaliar o prognóstico. A resposta ao tratamento pode ser avaliada por meio da razão proteína/creatinina na urina, além de outras medidas mais gerais da atividade da doença [revisado em (Manson & Rahman, 2006)].

O LES neuropsiquiátrico é visto em cerca de 20% dos casos. O diagnóstico é, muitas vezes, difícil de ser realizado. Não só existem 19 diferentes manifestações clínicas como descrito pelo ACR (1999), mas também não há um único e simples teste de diagnóstico. Em muitos casos, uma biópsia do cérebro seria o único teste definitivo, e isto é raramente executado. Tais manifestações incluem doenças do sistema nervoso central, causando dor de cabeça e convulsões, ou diagnósticos psiquiátricos, incluindo depressão e psicose, e também o envolvimento do sistema nervoso periférico, causando neuropatia.

Quanto à frequência de doença musculoesquelética, artralgia e mialgia ocorrem na maioria dos pacientes. O envolvimento da pele no lúpus também é muito comum. Além das erupções malar e discóide clássicas, a fotossensibilidade está frequentemente presente

e, além disso, a exposição ao sol é conhecida por desencadear crises sistêmicas da doença. Alopecia e úlceras na boca também são sinais característicos da doença. Outras manifestações orais incluem secura, como um resultado da síndrome de Sjögren secundária, e as pacientes podem manifestar ainda secura dos olhos e vagina. Características hematológicas incluem anemia normocítica normocrômica, trombocitopenia (por vezes, mas não sempre associada a anticorpos antifosfolípidos) e leucopenia. Doença hematológica severa pode ocorrer, mas é relativamente rara. Pleurite, causando dor no peito, tosse e falta de ar, é a manifestação pulmonar mais comum do LES. Embora os sintomas pleuríticos possam se relacionar diretamente ao lúpus ativo, embolia pulmonar deve sempre ser considerada, particularmente naqueles pacientes que apresentam anticorpos antifosfolípide. O envolvimento gastrointestinal mais comumente resulta em dor abdominal não específica. Hepatoesplenomegalia pode ir e vir com a atividade da doença [revisado em (Manson & Rahman, 2006)]. O LES pode estar associado com uma ampla variedade de manifestações vasculares. O fenômeno de Raynaud (causado pela vasoconstrição, com conseqüente redução do fluxo sanguíneo para a pele) foi visto em 16% dos pacientes em um estudo com Europeus (Cervera *et al.*, 2003). Na última década, tornou-se claro que os pacientes com LES apresentam um maior risco de aterosclerose. A inflamação crônica e o uso de corticosteróides contribuem para este risco. Ward mostrou que, em mulheres entre 18 e 44 anos de idade, aquelas com LES tinham duas vezes mais chance de desenvolver um infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral (Ward, 1999).

Quanto aos achados laboratoriais, mais de 90% dos pacientes com LES apresentam positividade para ANA. Títulos significativos são aceitos como sendo de 1:80 ou superior. Positividade para ANA, embora sensível, está longe de ser específica para o lúpus. A presença destes anticorpos também é vista em muitas outras doenças, incluindo esclerose sistêmica e polimiosite, bem como em algumas infecções crônicas. Todos os doentes devem ser rastreados para antígenos nucleares extraíveis (ENA). Diferentes ENAs estão associados a diferentes manifestações da doença. Por exemplo, anti-Sm está associado com envolvimento renal e anti-Ro com Síndrome de Sjögren secundária. Os anticorpos anti-DNA dupla-fita (dsDNA) e, mais recentemente, anti-nucleosomos são mais específicos para o LES, e títulos de anti-dsDNA também são preditivos de envolvimento renal. Além

disso, os títulos de anticorpos flutuam com a atividade da doença [revisado em (Manson & Rahman, 2006)].

O LES tende a ser mais grave em homens do que em mulheres, e com um pior prognóstico também. Homens apresentam maior frequência de manifestações cutâneas, serosite, doença renal, convulsões e neuropatia periférica em relação às mulheres. Portanto, é fundamental considerar a natureza mais severa da doença em homens no diagnóstico e no acompanhamento destes pacientes (Yacoub Wasef, 2004).

Apesar dos avanços significativos no tratamento ao longo dos últimos anos, o LES ainda confere um risco significativo de mortalidade e morbidade em longo prazo. Um estudo Europeu com 1.000 lúpicos demonstrou uma probabilidade de 10 anos de sobrevivência de 92% do total de doentes. A média de idade de morte foi de 44 anos, mas com ampla variação, de 18-81 anos (Cervera *et al.*, 2003; Manson & Rahman, 2006). A causa da morte varia de acordo com a duração da doença. Numa coorte, pacientes com acometimento renal representaram o maior número de mortes em indivíduos com menos de cinco anos de doença e 23% das mortes tardias foram devidas a causas vasculares (Manson & Rahman, 2006; Moss *et al.*, 2002).

1.3 Epidemiologia

A verdadeira incidência do LES é difícil de ser estimada devido à complexidade do diagnóstico e varia de acordo com as características da população, como idade, sexo, origem étnica, período de tempo no qual a população foi avaliada, bem como mudanças nos critérios diagnósticos (Jimenez *et al.*, 2003; Manzi, 2001). Além disso, muitos dos estudos existentes foram baseados em populações de tamanho reduzido (Borchers *et al.*, 2010). Métodos variáveis para a coleta de dados e inconsistência em relação à definição de casos também contribuem para este problema (Manson & Rahman, 2006). A incidência de LES pode variar de 1 a 10 por 100.000 pessoas por ano na população mundial (Pons-Estel *et al.*, 2010). A prevalência varia de aproximadamente 40 casos por 100.000 indivíduos entre norte-europeus a mais de 200 por 100.000 pessoas entre afrodescendentes. No geral, é estimada em cerca de 1/1.000 pessoas (Johnson *et al.*, 1995; Moudi *et al.*, 2013). A prevalência é maior nas populações americanas afrodescendentes, afro-caribenhas, nativas norte-americanas, indianas, polinésias e chinesas quando comparada à população de ascendência europeia (Molokhia & McKeigue, 2006). Entretanto, a alta ocorrência de LES

em determinados grupos, como africanos ocidentais quando comparados a europeus, não parece ser esclarecida pelas diferenças nas frequências dos alelos em alguns *loci* onde associações com o LES foram encontradas, tais como aqueles na região do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) (Molokhia & McKeigue, 2006).

Em um estudo de Birmingham, Reino Unido, a prevalência foi de 27,7/100.000 na população geral, mas quase nove vezes maior em mulheres afro-caribenhas (Johnson *et al.*, 1995). Os dados de uma pesquisa de saúde nacional nos EUA mostraram uma prevalência de autorrelato de LES (sendo o diagnóstico dado por um médico) de 241/100.000. Reconhecendo que esta pode muito bem ser uma sobre-estimativa, que combina autorrelatos com evidências de uma prescrição atual para antimaláricos, corticosteróides ou outros medicamentos imunossupressores, esta estimativa fica em torno de 53,6/100.000 (Ward, 2004). Nos últimos 50-60 anos, houve um aumento de mais de dez vezes na incidência anual de LES nos países ocidentais industrializados. Este fato é possivelmente relacionado à exposição a fatores ambientais, e também devido ao aumento da detecção do LES (Tikly & Navarra, 2008).

O LES é uma doença rara antes dos 5 anos, com pico entre 10-15 anos. A incidência estimada é de 0,6/100.000 crianças/ano abaixo de 15 anos dependendo da população. Aproximadamente 15% dos indivíduos com LES terão o início de sua doença antes dos 18 anos de idade. As manifestações clínicas em crianças e adolescentes são semelhantes as dos adultos, tendendo a uma apresentação mais grave (Tucker, 2007).

O LES é mais comum entre mulheres, numa proporção de aproximadamente 9:1, principalmente comparando-se indivíduos em idade reprodutiva. Esse fato é atribuído a fatores hormonais, principalmente a efeitos do hormônio estrogênio (Lahita, 1999; Yacoub Wasef, 2004). Os primeiros sintomas surgem principalmente na idade reprodutiva, entre a 2ª e 4ª décadas de vida, apresentando pico de incidência entre 35 e 39 anos (Vilar & Sato, 2002). Embora incomum, o início da doença também pode ocorrer acima dos 65 anos. Conforme relatada em um recente estudo retrospectivo realizado na Tunísia, a frequência de casos de LES em idosos foi de 5,3%, com uma média de idade de 70 anos. Idosos com LES exibem manifestações clínicas e laboratoriais distintas da forma clássica e, por esse motivo, deve ser dada maior atenção a este subgrupo para evitar diagnósticos incorretos (Achour *et al.*, 2010).

Um estudo brasileiro mostrou uma incidência de LES em torno de 8,7 casos por 100.000 pessoas por ano, sendo que em mulheres a incidência era de 14 casos para cada 100.000 pessoas por ano e em homens 2,2 casos para cada 100.000 por ano (Vilar & Sato, 2002).

Na primeira metade do século 20, o tempo habitual entre o aparecimento do LES e a morte variava de 3 meses a 1 ano (Borchers *et al.*, 2004). Em 1950, apenas 50% dos pacientes com LES sobreviviam 5 anos após o diagnóstico. Na atualidade, graças ao melhor tratamento e diagnóstico precoce, 80% a 90% sobrevivem pelo menos 10 anos (Manzi, 2009). Nosso entendimento epidemiológico a respeito do lúpus mudou significativamente em apenas uma geração. Em 1950, pensava-se que o LES era uma condição rara que afetava predominantemente mulheres de cabelos claros, pele clara, e com uma "incapacidade para se bronzear". O diagnóstico da doença melhorou e aumentou com avanços e disponibilidade de testes imunológicos. A consciência das pessoas também tem crescido, juntamente com um impulso no desenvolvimento de medicamentos que resultou, por exemplo, na aprovação de Belimumab pela *US Food and Drug Administration* (FDA), em março de 2011, a primeira nova droga aprovada para o LES em 56 anos (Lim & Drenkard, 2015).

1.4 Etiologia

Apesar dos inúmeros esforços realizados, a etiologia do LES permanece desconhecida. A patogênese do LES é multifatorial, e a quebra da autotolerância imunológica, que caracteriza a doença, pode ser atribuída à interação entre múltiplos fatores genéticos, imunológicos, hormonais e outras influências ambientais (Borchers *et al.*, 2010; Crispin *et al.*, 2010; Ghodke-Puranik & Niewold, 2015).

Novos *loci* e genes têm sido associados com a ocorrência do LES. Muitos estudos têm revelado alterações bioquímicas que governam a função de células T e a produção de citocinas circulantes nestes pacientes. Elementos do sistema imune inato têm sido identificados como grandes contribuidores para o desenvolvimento da doença, embora uma série de estudos tenha dado atenção à desregulação do sistema imune adaptativo. Além disso, estudos recentes destacam a importância das alterações epigenéticas na expressão ou função anormal de fatores imunológicos (Crispin *et al.*, 2010).

1.4.1 Sistema Imunológico

A alteração no sistema imunológico dos pacientes com LES conduz a um desequilíbrio e perda da autotolerância. Várias alterações já foram descritas (Monticielo *et al.*, 2008; Pugh-Bernard & Cambier, 2006; Tsokos *et al.*, 2000). No contexto do LES, as células T fornecem ajuda a células B e montam resposta inflamatória, enquanto falham para produzir níveis suficientes de interleucina-2 (IL-2). Defeitos na bioquímica e expressão de genes têm sido identificados como responsáveis por essa função anormal. A ativação celular está alterada em células T de pacientes com LES (**Figura 1**). A ativação do receptor das células T (TCR)/CD3, leva a uma resposta de sinalização precoce e aumentada, manifestada por um aumento do fluxo de cálcio intracitoplasmático e fosforilação da proteína tirosina citosólica (Crispin *et al.*, 2010).

Após a exposição ao antígeno, as células T CD4⁺ naïve (virgens) se desenvolvem em subconjuntos de células efetoras, o que é definido pela expressão de fatores de transcrição distintos que induzem um fenótipo e perfil de produção de citocinas particulares. Pacientes com LES mostram produção anormal de citocinas e, portanto, capacidade efetora comprometida. A produção de IL-2, uma citocina envolvida no processo de ativação e proliferação de células T, encontra-se diminuída em células de pacientes com LES. Isto pode contribuir para a diminuição da atividade citotóxica, função prejudicada de células T regulatórias (Treg), e diminuída morte celular induzida por ativação.

IL-17A e F são produzidas principalmente por células T ativadas e desempenham papel importante em respostas imunes contra certas bactérias e fungos. O soro de pacientes lúpicos contém altos níveis de IL-17, e uma maior fração de células T CD4⁺ e duplo negativas (CD4⁻CD8⁻), as quais produzem IL-17. A liberação de IL-17 amplifica a resposta inflamatória por recrutar células efetoras aos órgãos alvo. Além disso, a IL-17 contribui para a formação de centros germinativos e, atuando em conjunto com um fator de ativação de células B, aumenta a sobrevivência e proliferação destas células e a sua indução em células secretoras de anticorpos. A diferenciação das células T em Th17 é induzida na presença de TGF-β e certas citocinas inflamatórias, tais como IL-1β, IL-6 ou IL-21. A diferenciação de células virgens em células pró-inflamatórias tem sido proposta ocorrer de um modo recíproco com o desenvolvimento de células Treg e a presença de um sinal inflamatório parece ser o fator que determina se células pró-inflamatórias ou supressoras

serão geradas (Crispin *et al.*, 2010; Korn *et al.*, 2009). Há relatos de uma elevação anormal de células Th17 e diminuição de Treg em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes com LES. O desbalanço entre células Th17 e Treg pode ter um papel importante na patogênese da doença (Cai *et al.*, 2012). Outros estudos também relatam número e funcionalidade alterados de células Treg nos pacientes com LES. Entretanto, a magnitude da contribuição destes defeitos na patologia e curso da doença ainda não é muito bem compreendida (Crispin *et al.*, 2004). Além disso, trabalhos apontam capacidade citotóxica deficiente de células T CD8⁺ em pacientes com a doença (Stohl, 1995).

Linfócitos T que não possuem os correceptores CD4 e CD8 são chamados de células T duplo-negativas (DN), que correspondem a uma população rara de células em indivíduos normais (<5% dos linfócitos T), mas que está significativamente aumentada em pacientes com LES. Estas células induzem a produção de anticorpos anti-DNA por células B autorreativas. Trabalhos recentes têm mostrado que esta subpopulação de células também secreta outras citocinas, tais como IL-1 β e IL-17, e é encontrada como infiltrado celular em biópsias renais de pacientes com lúpus nefrite. Células DN representam uma fração de células T CD8⁺ que, após ativação, adquire um perfil de expressão gênica distinto, o qual induz a perda de expressão de CD8 e a capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias (Crispin *et al.*, 2008; Crispin & Tsokos, 2009).

Assim como linfócitos T, células B também são comumente afetadas em pacientes com LES. Linfopenia de células B e hiperatividade destas células estão entre as anormalidades mais marcantes encontradas no LES. Os linfócitos B destes pacientes produzem uma série de autoanticorpos contra constituintes solúveis e celulares, mas a maior parte contra antígenos intranucleares (Crispin *et al.*, 2010).

Estudos recentes têm relatado uma função estimulada de monócitos e células dendríticas (DCs) na doença (Ding *et al.*, 2006). Já outros estudos descreveram número e função de DCs normais ou diminuídos quando comparados a células de indivíduos normais (Koller *et al.*, 2004).

Sob condições fisiológicas, a presença de células apoptóticas é interpretada pelo sistema imune como um sinal anti-inflamatório. Assim, quando DCs capturam fragmentos de células apoptóticas, autoantígenos são apresentados levando à inativação de eventuais células T autorreativas. Enquanto as células necróticas ingeridas são capazes de induzir a

maturação de DCs, as células apoptóticas não conseguem ativá-las em circunstâncias normais. Distúrbios na apoptose e/ou no *clearance* de células apoptóticas podem ter um papel importante na patogênese do LES (Crispin *et al.*, 2010; Kaplan, 2004).

O SC, que envolve tanto o sistema imune inato quanto adaptativo, é particularmente importante na patogênese do LES (Truedsson *et al.*, 2007). Apresenta papel central na resposta inflamatória, sendo importante para a destruição de microorganismos através da opsonização, ativação leucocitária e lise de células-alvo. No contexto do LES, o SC é responsável pela remoção de complexos imunes. Esse sistema pode ser ativado por três diferentes vias: a via clássica, a via alternativa e a via da lectina. Há muitas deficiências associadas com essas vias, que podem desencadear desordens autoimunes, como o LES, e a susceptibilidade a infecções (Dommett *et al.*, 2006; Monticelo *et al.*, 2008; Zimmermann-Nielsen *et al.*, 2005).

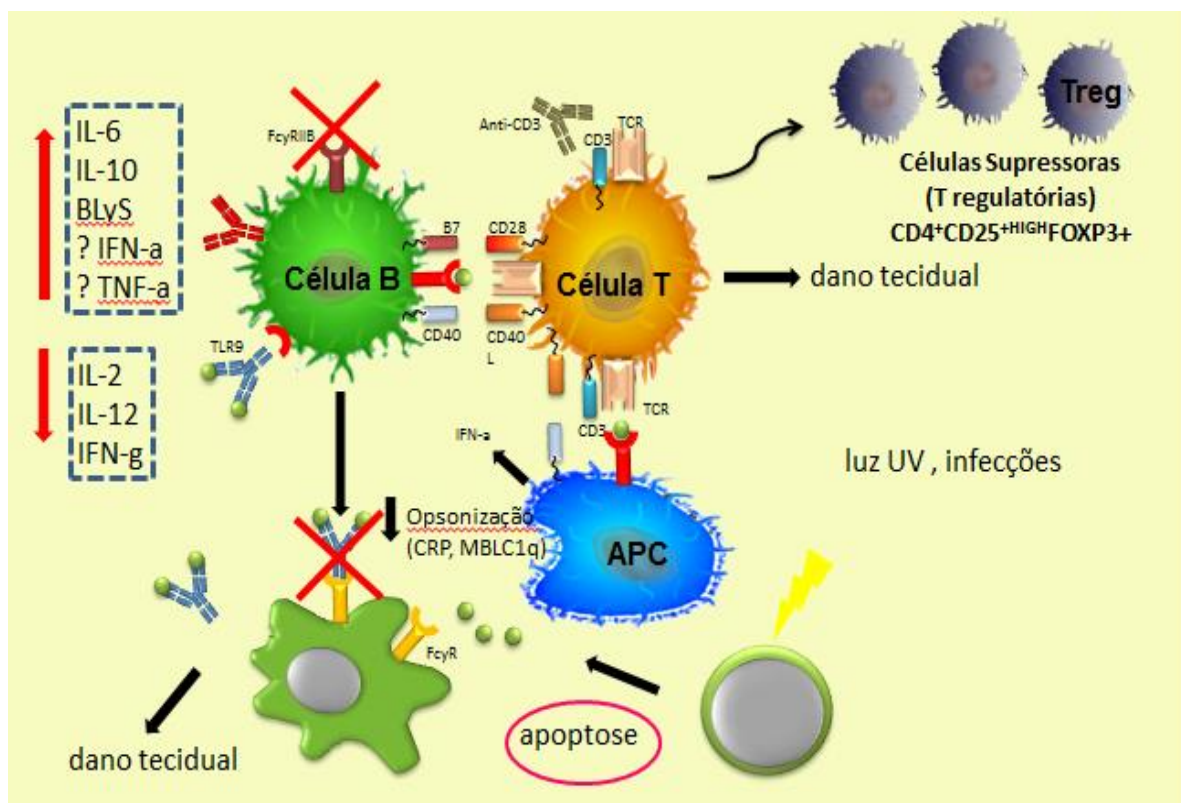


Figura 1. Esquema mostrando os defeitos na tolerância imunológica em pacientes com LES (Adaptado de Kytтарыs *et al.*, 2006). Nos pacientes com LES, fatores hormonais e ambientais interagem com uma multiplicidade de genes, conduzindo à perda da autotolerância. Células dendríticas apresentam autoantígenos no contexto do MHC para células T autorreativas e, ao mesmo tempo, há a produção de interferon-alfa entre outras citocinas. As células T mostram padrão

de ativação anormal, com aumento da sobrevivência e diminuição da função reguladora, fornecendo ajuda às células B. As células B ativas mostram diminuição do número e função de receptores inibitórios, tornando-se plasmócitos e produzindo autoanticorpos. Além disso, as células B ainda contribuem para desregular células T, através da produção de autoanticorpos anti-CD3/TCR que limitam a produção de IL-2 pelas células T. A apoptose contribui para o excesso de restos celulares que não são tratados adequadamente por mediadores solúveis e por células. Isto resulta na formação de complexos imunes que ativam ainda mais as células B e se depositam nos tecidos.

APC: célula apresentadora de antígenos. BLYS: estimulador de linfócito B. CRP: proteína regulatória do complemento. FcγRIIB: receptor para a porção Fc das imunoglobulinas. FoxP3: fator de transcrição Forkhead Box P3. IFN: interferon. IL: interleucina. MBL: Proteína de Ligação à Manose. TCR: receptor de células T. TLR: receptor do tipo Toll. TNF: fator de necrose tumoral. Treg: célula T regulatória. UV: ultravioleta.

1.4.2 Fatores Ambientais e Ocupacionais

Ainda pouco se sabe sobre a influência de exposições ocupacionais e ambientais no risco de desenvolver LES. No entanto, a contribuição do meio ambiente para a expressão do LES é inquestionável, como exemplificado pela concordância clínica da doença em gêmeos monozigóticos ser limitada a menos do que a metade dos pares de irmãos. A exposição à luz ultravioleta (UV) e várias toxinas ambientais, incluindo àquelas contidas no fumo, têm sido relacionadas à doença em estudos epidemiológicos (Crispin *et al.*, 2010; Rahman & Isenberg, 2008). A luz solar é considerada um fator ambiental que pode exacerbar a doença. Queratinócitos de pacientes com LES apresentaram citotoxicidade aumentada quando irradiados com luz UV, que pode estimulá-los a expressar antígenos nucleares em sua superfície e aumentar a secreção de citocinas que estimulariam linfócitos B a produzir anticorpos autorreativos (Casciola-Rosen *et al.*, 1994; Cooper *et al.*, 1998; Furukawa *et al.*, 1999; Lehmann *et al.*, 1990).

Metais pesados, como o mercúrio, podem induzir doenças renais autoimunes ou síndromes como o LES. Estudos epidemiológicos relatam o envolvimento de pó da sílica com o LES e outras doenças autoimunes (Brown *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 1998). A exposição à sílica pode aumentar a geração de material apoptótico, considerado uma importante fonte de autoantígenos (Parks & Cooper, 2005). Em uma população urbana de Boston, realizou-se uma avaliação do risco de LES associado com a exposição ocupacional ao pó da sílica e a solventes orgânicos e se encontrou associação entre a exposição à sílica

por mais de um ano e a ocorrência de LES. Por outro lado, uma associação entre a exposição a solventes orgânicos e o LES não foi encontrada nesta região (Finckh *et al.*, 2006).

Mudanças epigenéticas, como a metilação do DNA também têm sido consideradas como fatores associados com o LES. Algumas drogas comumente usadas, como a hidralazina e a procainamida, inibem a metilação do DNA e podem induzir lúpus em indivíduos saudáveis. A desmetilação do DNA causa produção aumentada de citocinas por células T CD4⁺ e hiperprodução de IgG por células B que superexpressam moléculas coestimulatórias CD70 e CD40L (Crispin *et al.*, 2010). Pacientes com LES relataram aumento de reações alérgicas a medicamentos, particularmente com relação a antibióticos. A alergia a medicações foi associada com um risco 3,1 vezes maior de desenvolver LES. Outros estudos também sugeriram que enquanto a procainamida e a hidralazina se associam com maior risco de LES, a quinidina se associa com um risco moderado. A injeção, no timo, de procainamida-hidroxilamina, um metabólito reativo da procainamida, induz autotolerância, aparecimento de linfócitos T reativos à cromatina e produção de anticorpos contra a cromatina (Kretz-Rommel & Rubin, 2000).

Recentemente, o lúpus induzido por drogas foi associado com o uso de inibidores de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interferons (IFN). Os mecanismos responsáveis pelo seu desenvolvimento podem variar dependendo da droga ou do paciente. O lúpus induzido por drogas é caracterizado pelo surgimento de manifestações clínicas após a exposição, sendo que após a suspensão da droga, há completo desaparecimento das alterações clínicas e laboratoriais (Chang & Gershwin, 2011; Cooper *et al.*, 2002b).

Infecções virais, incluindo o parvovírus B19 e citomegalovírus, são comuns em pacientes com LES (Ramos-Casals *et al.*, 2008). Notavelmente, muita discussão tem sido feita em torno da idéia de que infecções virais podem desencadear o LES (Aslanidis *et al.*, 2008). A alta prevalência de Epstein-Barr vírus (EBV) na população adulta faz com que seja difícil tirar conclusões definitivas sobre a causalidade, mas há evidências convincentes de que a infecção pelo EBV precede o desenvolvimento do LES. Em um estudo, no qual amostras de soro foram examinadas em pacientes antes e após desenvolverem LES, foi observado que todos os pacientes desenvolveram anticorpos para o antígeno nuclear 1 do vírus Epstein-Barr (EBNA-1) antes do desenvolvimento de autoanticorpos e da doença (McClain *et al.*, 2005). Um nível mais elevado de soropositividade para EBV tem sido descrito em

pacientes com LES pediátrico em comparação com crianças saudáveis (James *et al.*, 1997). Enquanto a infecção viral crônica pode levar à exaustão das células T, os vírus também têm sido implicados no desenvolvimento de autoimunidade, através do mimetismo molecular. Algumas proteínas virais são semelhantes a autoantígenos e, portanto, induzem respostas imunológicas específicas que podem reagir de forma cruzada com autoantígenos. Por exemplo, a proteína EBNA-1 de EBV pode reagir de forma cruzada com anticorpos direcionados contra o autoantígeno Ro, um alvo comum de autoanticorpos. O mimetismo molecular também é observado entre epítomos bacterianos e parasitários (Crispin *et al.*, 2010).

1.4.3. Fatores Hormonais e Reprodutivos

O papel dos hormônios sexuais na patogênese do LES é complexo, interativo e dinâmico (McMurray, 2001). Os hormônios desempenham uma importante função imunorregulatória e, portanto, alterações em suas concentrações podem ser relevantes, influenciando tanto a incidência, quanto o curso clínico da doença (McMurray & May, 2003).

Considerando-se que o LES é manifestado principalmente em mulheres (80-90% dos pacientes), presume-se que os hormônios sexuais femininos tenham grande importância no seu desenvolvimento. A baixa frequência de LES entre os homens e o início da doença em mulheres na pós-menopausa ou em mulheres pré-púberes sugere um papel do estrogênio na predisposição à doença (Chan & Mok, 2013). A influência do estrogênio no LES é complexa e difícil de ser investigada, devido a incidência da doença ser relativamente baixa na população em geral. Mulheres com LES têm um risco aumentado de distúrbios no início da primeira menarca e menopausa, distúrbios cardiovasculares, aterosclerose prematura e trombose, fraturas devido à osteoporose, comprometimento cognitivo e qualidade de vida reduzida, quando comparadas com mulheres saudáveis. A influência dos estrogênios sobre o desenvolvimento de LES permanece incerta, visto que há dados conflitantes na literatura. Alguns deles abordam a influência negativa desses hormônios no sistema imune, especialmente em pacientes com predisposição genética, enquanto outros mostram uma influência positiva [revisado em (Grygiel-Gorniak & Puszczewicz, 2014)]. Segundo McMurray, a maioria dos dados disponíveis sugere que o estrogênio é supressor de imunidade mediada por células, a

dehidroepiandrosterona (DHEA)/testosterona é supressora tanto da imunidade celular quanto da humoral, e a prolactina é estimulatória para a imunidade humoral. Quanto ao papel da progesterona na patogênese da doença, os dados mostraram-se inconclusivos (McMurray, 2001).

Há evidências para um papel oposto de estrogênios e androgênios na patogênese do LES. Reforçando o papel dos hormônios femininos no risco de LES, um estudo relatou que um indivíduo transexual masculino para feminino desenvolveu a doença 20 anos após a cirurgia de redesignação de sexo e uso prolongado de terapia com estrogênio (Chan & Mok, 2013).

Visto que mulheres frequentemente usam suplementação farmacológica de estrogênios em diferentes períodos da vida, muitos estudos têm tentado avaliar o seu impacto na saúde. O efeito desses hormônios é particularmente importante nas mulheres lúpicas, devido ao risco aumentado associado com a terapia hormonal por si só, além do curso da doença (Chan & Mok, 2013; Grygiel-Gorniak & Puszczewicz, 2014; McMurray & May, 2003). Hormônios esteróides, tais como 17 β -estradiol, testosterona, prolactina, progesterona e DHEA influenciam a regulação do sistema imunológico e a atividade do LES [revisado em (Grygiel-Gorniak & Puszczewicz, 2014)]. A terapia de reposição hormonal pode induzir crises de lúpus e eventos tromboembólicos venosos ou cardiovasculares (Gompel & Piette, 2007).

O estrogênio estimula tímócitos, linfócitos TCD8⁺ e TCD4⁺, linfócitos B e macrófagos, além de estimular a liberação de citocinas e a expressão de moléculas do HLA, classes I e II, e moléculas de adesão endotelial (Cutolo *et al.*, 1995). Já os androgênios tendem a ser imunossupressores (Lahita, 1990). O equilíbrio entre níveis de estrogênios e androgênios parece então influenciar a resposta imune (Cooper *et al.*, 2002a).

Estudos com modelos murinos mostraram que o estrogênio ou a prolactina podem levar a um fenótipo autoimune, causando aumento da maturidade de células B autorreativas. Também foi observado que a prolactina acelera o desenvolvimento da doença em camundongos propensos ao lúpus (Cohen-Solal *et al.*, 2008; Crispin *et al.*, 2010). Níveis elevados de prolactina em crianças pré-púberes (6-13 anos) com LES correlacionaram-se com a atividade da doença e com manifestações no sistema nervoso central (El-Garf *et al.*, 1996).

A gravidez, em geral, pode agravar o LES, mas isso não ocorre em função do aumento dos hormônios estradiol ou progesterona. Na verdade, os níveis desses hormônios são mais baixos no segundo e terceiro trimestres em pacientes com LES em comparação com mulheres saudáveis grávidas. Essas variações hormonais resultam em uma menor ativação da resposta imune humoral, provavelmente relacionada a uma mudança no balanço estrógeno/andrógeno, o que poderia explicar a diminuição da atividade da doença observada durante o terceiro trimestre da gestação nestas pacientes (Doria *et al.*, 2002).

Também se propôs, recentemente, que cromossomos sexuais podem influenciar a expressão do LES. Estudos com camundongos machos e fêmeas gonadectomizados, XX, XO (fêmea), XY ou XXY (macho), indicaram que a presença de dois cromossomos X aumenta a gravidade da doença (Crispin *et al.*, 2010; Smith-Bouvier *et al.*, 2008).

1.4.4 Base Genética

O entendimento da base genética do LES tem progredido rapidamente nos últimos anos. Enquanto uma série de polimorfismos têm sido associados com a susceptibilidade à doença, o grande passo seguinte envolve a integração destes polimorfismos genéticos com os mecanismos moleculares e com a imunologia celular da doença (Ghodke-Puranik & Niewold, 2015).

Estudos de agregação familiar e com gêmeos monozigóticos firmemente apoiam a existência de predisposição genética para o LES. Estudos de agregação familiar demonstraram que irmãos de pacientes com LES apresentaram maior risco relativo (RR: 23,68; IC 95% 20,13-27,84) de desenvolver a doença em comparação com a população geral (Alarcon-Segovia *et al.*, 2005). Nesse mesmo sentido, a taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos (~30%) é dez vezes maior do que em gêmeos dizigóticos (~3%) (Deapen *et al.*, 1992; Ghodke-Puranik & Niewold, 2015; International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus *et al.*, 2008). Parentes em primeiro grau de pacientes com LES têm um risco 20 vezes maior de desenvolver a doença em comparação com a população geral dita saudável. No entanto, dentro das famílias com múltiplos membros afetados, a ocorrência de LES não costuma seguir um padrão de herança mendeliana clássica. Enquanto a etiologia da maioria dos casos de LES parece ser geneticamente complexa, alguns poucos casos podem ser atribuídos a mutações raras altamente penetrantes (Ghodke-Puranik & Niewold, 2015). Embora grande parte da herdabilidade da

doença ainda permaneça a ser explicada, avanços recentes têm aumentado significativamente o nosso conhecimento sobre a base genética da susceptibilidade ao LES. Estes incluem estudos de múltiplas populações, diferentes estudos genéticos de fenótipos do sistema imunológico e estudos genéticos funcionais examinando o papel da variação genética na regulação da transcrição e funcionamento de células (Niewold, 2015).

Há um consenso de que a susceptibilidade genética ao LES é determinada por um conjunto de variantes alélicas relativamente comuns na população que, individualmente, contribuem de forma modesta para o risco de desenvolver a doença (Borchers *et al.*, 2010). É difícil prever quantos genes contribuem para a sua predisposição. Estima-se que mais de 100 genes estejam envolvidos (Horiuchi *et al.*, 2009). Muitos trabalhos têm identificado marcadores genéticos associados à doença, envolvendo diferentes vias, processos e tipos celulares (Deng & Tsao, 2010; Fraser *et al.*, 2003; Jakab *et al.*, 2007). Há na literatura uma diversidade de relatos acerca de mecanismos genéticos pelos quais polimorfismos impactam na biologia molecular do LES (Ghodke-Puranik & Niewold, 2015).

Nos últimos dez anos, o entendimento da base genética do LES se acelerou ainda mais com os estudos de associação do genoma (GWAS), que levaram à identificação de novos genes candidatos por meio de estudos de mapeamento fino (Rhodes & Vyse, 2008). Diversos trabalhos de GWAS já foram realizados em pacientes com LES em várias populações de diferentes etnias e, atualmente, mais de 40 *loci* de risco foram relacionados à susceptibilidade ao LES em estudos de caso-controle (Ghodke-Puranik & Niewold, 2015). Esse tipo de análise fornece uma poderosa ferramenta para a identificação dos fatores de susceptibilidade a doenças complexas. Além disso, como o número destes estudos está crescendo rapidamente, isso resultou na descoberta de novas associações e replicação de diversas associações de genes relacionados à doença. Meta-análises de conjuntos de dados de GWAS aumentam o poder de detectar associações através do aumento do tamanho da amostra e por permitir a análise de diversas variantes (Ghodke-Puranik & Niewold, 2015; Lee *et al.*, 2012). Publicada em 2012, uma meta-análise de dois GWAS foi realizada utilizando 737.984 SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) em 1.527 casos de LES e 3.421 controles de ancestralidade europeia. Neste estudo, o resultado mais significativo foi a associação de um SNP (rs2051549) na região do HLA com a susceptibilidade ao LES. Também, identificaram-se cinco SNPs candidatos em regiões não-HLA (*STAT4*, *TNPO3*, *BLK*, *FAM167A*, e *IRF5*). Neste trabalho, corroboraram-se

ainda as evidências para a maioria dos *loci* de susceptibilidade conhecidos no gene *HLA-DR* (Lee *et al.*, 2012). Alelos HLA também têm sido associados com a produção de autoanticorpos em pacientes com LES (Graham *et al.*, 2007). Além disso, uma hipótese atrativa é a de que alelos HLA associados ao LES possam corresponder a uma molécula de MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) alterada que apresenta autoantígenos de um modo anormal, levando à formação de autoanticorpos contra estes autoantígenos (Niewold, 2015).

A frequência aumentada de certos haplótipos HLA em pacientes lúpicos revela a importância dos genes do sistema imune no desenvolvimento da doença (Huang *et al.*, 2003). O haplótipo *HLA DR3-DQ2-C4AQ0* está fortemente associado ao LES em eurodescendentes (Jonsen *et al.*, 2004). Um estudo mostrou um aumento significativo na frequência dos haplótipos *HLA-DRB1*0301*, *DQA1*0501* e *DQB1*0201* em pacientes comparados a controles (Granados *et al.*, 2006). Nessa direção, o gene do *TNF- α* está localizado dentro da região MHC, no cromossomo 6. O polimorfismo *TNF- α -308A*, na região promotora do gene, já foi associado com o aumento da produção de *TNF- α* . Este polimorfismo encontra-se em forte desequilíbrio de ligação com o haplótipo *HLA B8, DR3*, que confere um risco 2 a 3 vezes maior de LES (Ahmad & Bruce, 2001; Rood *et al.*, 2000; Sullivan, 2000; Werth *et al.*, 2000).

Deficiências hereditárias completas ou parciais de componentes do SC, tais como as que envolvem C1q, C1r, C1s, C4 e C2, e alelos nulos de *C4A (C4AQ0)*, também já foram descritas como fatores de susceptibilidade ao LES (Huang *et al.*, 2003; Saevarsdottir *et al.*, 2006). O *clearance* defeituoso do material apoptótico poderia ser uma consequência destas deficiências, determinando exposição prolongada de autoantígenos ao sistema imune e a geração de anticorpos contra os mesmos (Monticelo *et al.*, 2008). Muitos dos genes candidatos para a predisposição à doença desempenham um papel fundamental na apoptose e no ciclo celular. A autofagia, quando excessiva, pode desencadear apoptose e este processo é controlado por genes que atuam em um sistema de conjugação tipo-ubiquitina. O gene *ATG5* (proteína de autofagia 5) pode agir como um interruptor, determinando se a autofagia progredirá para a apoptose e, devido a esta atuação, é considerado como um excelente gene candidato para a predisposição à doença (Rhodes & Vyse, 2008).

Além destes, o gene que codifica a Proteína de Ligação à Manose (MBL), estruturalmente similar a C1q, tem emergido como um candidato à predisposição ao LES, devido ao papel da MBL na imunidade inata e à possível associação entre a sua deficiência e doenças autoimunes (Glesse *et al.*, 2011; Monticelo *et al.*, 2010; Sandrin-Garcia *et al.*, 2011).

Há um precedente forte de que os alelos de susceptibilidade genética para o lúpus possam ser diferentes entre as distintas populações humanas, como será salientado nos parágrafos a seguir. O gene da proteína tirosina fosfatase, não-receptor tipo 22 (*PTPN22*), que codifica uma proteína conhecida por regular negativamente a ativação de células T, é um exemplo de um fator de risco genético bem estabelecido para o LES (Chung & Criswell, 2007; Criswell, 2008; Kaufman *et al.*, 2006; Niewold, 2015). Um estudo realizado na Grécia relatou que o alelo T do SNP *C1858T* do gene *PTPN22* foi mais comum entre pacientes com LES do que em indivíduos controle (Eliopoulos *et al.*, 2011). A substituição de uma arginina por um triptofano leva a um ganho de função e a variante do gene codifica uma fosfatase mais ativa. Vang *et al.* mostraram que a proteína resultante desta variação é um potente inibidor da sinalização de TCR (Chung & Criswell, 2007; Vang *et al.*, 2005).

Um recente estudo revelou que genes relacionados à família IRF de fatores de regulação do interferon (*IRF5*) e um membro da família JAK (*TYK2*) foram significativamente associados à predisposição aos LES em uma população chinesa Han (Tang *et al.*, 2015). Um haplótipo de *IRF5* foi também implicado como fator de risco para o LES em um outro estudo (Graham *et al.*, 2006). Interessantemente, este alelo não foi identificado em populações africanas da África Subsaariana. O alelo de risco promove a formação de autoanticorpos no LES e também foi associado a maiores níveis de IFN tipo I em pacientes com LES (Niewold *et al.*, 2012).

Estudos de GWAS recentes revelaram novas associações em pacientes asiáticos com LES que eram exclusivas para estas populações, como o oncogene *ETSI* (*v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1*), *IKZF1* (*IKAROS Family zinc finger 1*), *RASGRP3* (*RAS guanyl releasing protein 3*), dentre outros (Han *et al.*, 2009; Niewold, 2015). Em contrapartida, um estudo com pacientes lúpicos afro-americanos observou que alguns alelos de risco descobertos na população europeia também eram relevantes nesta população, tais como o gene *BANK1* (*B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1*),

ITGAM (*integrin, alpha M - complement component 3 receptor 3 subunit*), *IRF7* (*interferon regulatory factor 7*) e *SRC* (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase*) (Nath *et al.*, 2008; Sanchez *et al.*, 2011).

Polimorfismos genéticos em genes que codificam γenzimas da família Glutathione S-transferase (GST) e da superfamília do citocromo P450 (CYP), envolvidos na detoxificação e metabolização de xenobióticos, tais como os genótipos *GSTT1* nulo, *GSTM1* nulo, bem como os alelos *GSTP1*Val* e *CYP2E1*5B* podem também contribuir para a patogênese da doença (Glesse *et al.*, 2014; Salimi *et al.*, 2015).

A expressão alterada de genes reguladores de interferon-α também tem sido relatada em pacientes com LES, podendo estar associada a mutações no gene *TREX1*, que codifica uma exonuclease de DNA. Um prejuízo na sua atividade pode resultar em acúmulo de ácido nucléico nas células, desencadeando uma condição autoimune (Fredri *et al.*, 2015).

Receptores Fc gama (FcγRs) ligam-se à região Fc, região constante, da imunoglobulina G e transmitem o sinal estimulador ou inibidor para as células do sistema imune. Uma recente publicação mostrou que polimorfismos genéticos dentro de FcγRIIB foram associados com a susceptibilidade ao LES e com os fenótipos da doença em Coreanos (Jeon *et al.*, 2015).

Variantes que conferem risco genético, descobertas em doenças autoimunes, estão frequentemente localizadas em regiões regulatórias ao invés de regiões codificantes dos genes. Isto também ocorre no LES, onde muitos polimorfismos encontrados nos genes próximos a regiões regulatórias provavelmente impactam na biologia celular por alterar a expressão do gene (**Figura 2**). *UBE2L3* é um exemplo de haplótipo funcional, que tem um polimorfismo na região promotora, conferindo expressão aumentada do RNAm de *UBE2L3* e da proteína. Este haplótipo também está associado com o aumento da expressão de NF-κB (factor nuclear kappa B) em células B (Lewis *et al.*, 2015).

O gene *IL-10* é outro exemplo de gene que confere risco ao LES, com polimorfismos que apresentam função regulatória, dentro de uma região de ligação para o fator de transcrição Elk-1. O estudo de Sakurai e colaboradores, em 2013, foi capaz de demonstrar que a única mudança de base codificada pelo alelo de risco resultou em uma ligação alternativa do fator de transcrição Elk-1. Notou-se que a expressão de IL-10 e Elk-

1 fosforilado estavam elevadas em pacientes com LES e se correlacionaram com a atividade da doença (Sakurai *et al.*, 2013).

No presente estudo, focamos em avaliar polimorfismos localizados em regiões regulatórias de genes que controlam a morte celular programada (apoptose), tais como *FAS*, *FASL*, *BAX* e *BCL-2*. Estes polimorfismos são responsáveis por alterar a expressão dos genes e, possivelmente, a expressão de proteínas que determinam a ativação de cascatas de sinalização de morte celular, que serão abordados com mais detalhes adiante.

Conseqüências funcionais das variantes citadas anteriormente envolvem a desregulação do sistema imunológico (**Figura 3**), incluindo defeitos na ativação, diferenciação e função de células B e T, células dendríticas e outras células do sistema imune; degradação de proteínas, transporte anormal de peptídeos através das membranas celulares, defeitos nas vias do complemento, disfunção reticulo-endotelial, produção anormal de imunoglobulinas, células apoptóticas e liberação de hormônios, dentre outros (Crispin *et al.*, 2010; Garrett-Sinha *et al.*, 2008; Monticielo *et al.*, 2008).

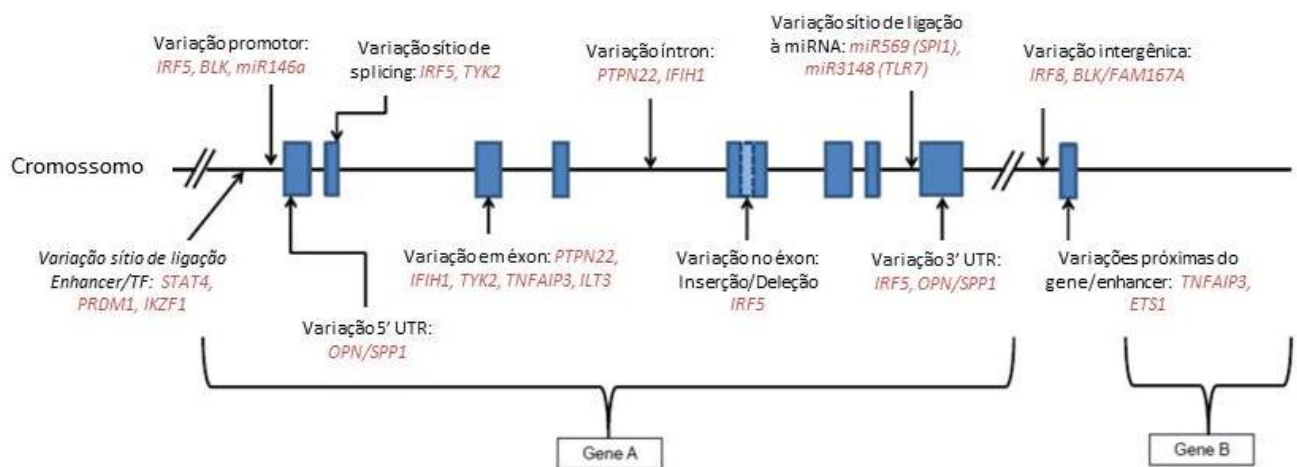


Figura 2. Diagrama esquemático de um gene hipotético, com a localização de alguns genes que apresentam variantes funcionais associadas ao LES. Variantes associadas ao LES estão localizadas em várias regiões através do genoma, como regiões regulatórias, éxons, sítios de splicing, íntrons e regiões intergênicas conhecidas. (Adaptado de Ghodke-Puranik & Niewold, 2015).

Painel A

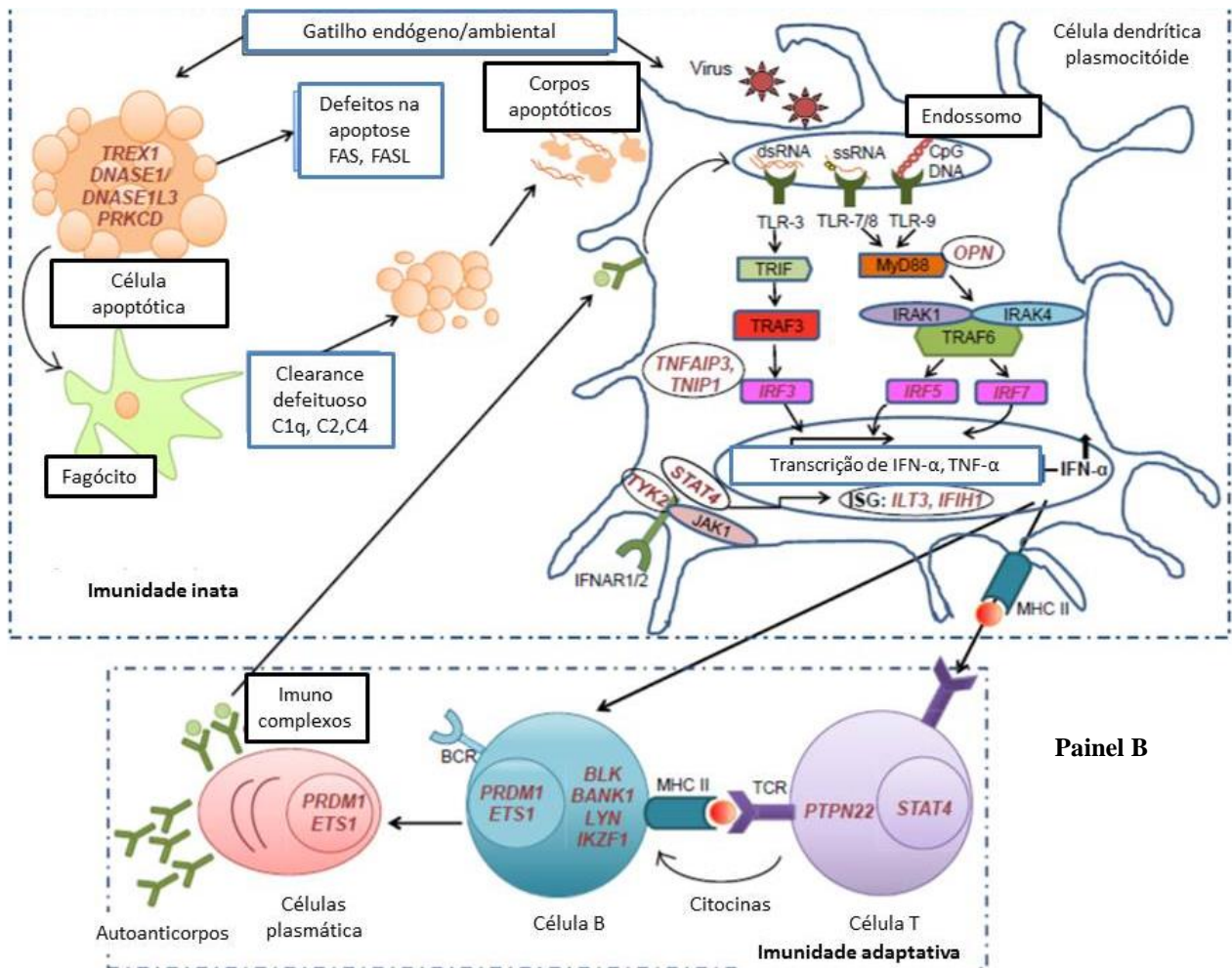


Figura 3. Principais vias e tipos celulares envolvidos na LES, com genes de risco mostrados no tipo celular a que se presume função. O **painel A** mostra os genes que influenciam diferentes tipos de células envolvidas na resposta imune inata, enquanto que o **painel B** mostra os genes que têm impacto sobre vários tipos de células envolvidas na resposta imune adaptativa (Adaptado de Ghodke-Puranik & Niewold, 2015). MHC: complexo principal de histocompatibilidade. BCR: receptor de célula B. TCR: receptor de célula T.

Compreender os mecanismos funcionais de variantes genéticas envolvidas na doença humana facilita muito a nossa capacidade de traduzir as associações genéticas para um atendimento mais personalizado, e assim nos permite identificar novos alvos terapêuticos relevantes para o combate da doença (Ghodke-Puranik & Niewold, 2015).

1.5 Células T regulatórias (Treg) e o LES

Os mecanismos imunológicos regulatórios que mantêm a autotolerância e previnem a autoimunidade são mediados, em parte, por uma subpopulação de células T, as células Treg, que se caracterizam por ser $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$, e que expressam o fator de

transcrição Foxp3, indicando reunirem as características necessárias para desempenhar o papel de supressão em uma resposta imune. Estas células são consideradas naturalmente ativas e presentes no organismo em frequências relativamente baixas (Sakaguchi *et al.*, 2007). As células Treg desenvolvem-se naturalmente no timo (nTreg) e na periferia (Tregs induzidas) (Singh *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2008). As Treg naturais correspondem de 5 a 10% das células T CD4⁺ do sangue periférico em humanos e camundongos (Yan *et al.*, 2008). Atuam suprimindo linfócitos T autorreativos, através da inibição da ativação e expansão de células CD4⁺ T auxiliares e também da diferenciação de células T CD8⁺ citotóxicas e de células B (Ohl & Tenbrock, 2015). Além disso, também é sugerido que as células Treg humanas podem inibir a produção de anticorpos pelas células B e a produção de IFN- γ pelas células *Natural Killer* (NK) e células T citotóxicas. A capacidade supressora deste subgrupo é mediada pela secreção de citocinas anti-inflamatórias, como TGF- β e IL-10, contato célula-célula e mesmo através de transferência ativa de pequenos metabólitos (Vignali *et al.*, 2008). A característica marcante das células Treg é a expressão do fator de transcrição Foxp3 (Marson *et al.*, 2007). A demonstração de que baixos níveis de expressão de CD127 e altos níveis de CD25 apresentam uma forte correlação com a expressão de Foxp3 foi um avanço crucial para a identificação de células Treg baseada em marcadores de membrana (Bacchetta *et al.*, 2006; Levings *et al.*, 2006).

Vários estudos relataram uma diminuição do número e função das Treg em várias doenças autoimunes humanas. O número de Treg alterado foi observado em doentes com diabetes tipo I, micose fungóide, doença do enxerto-versus-hospedeiro e artrite reumatóide. No entanto, o aumento do número de células Treg funcionalmente ativas tem sido detectado no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide. No LES, dados contraditórios sobre o papel deste subgrupo de células têm sido apresentados na literatura. Torna-se difícil analisar se as alterações na população de Treg são causadoras de doenças autoimunes ou simplesmente um epifenômeno. Diminuição do número de Treg no sangue periférico tem sido relatada pela maioria dos estudos com pacientes com LES ativo, mas a função normal ou mesmo o número aumentado de Treg também têm sido descritos. Além disso, tanto a capacidade supressiva deficiente quanto normal de Treg isoladas também já foram observadas em pacientes com LES. Os dados obtidos em estudos com camundongos mostram claramente que o número de células Treg reduzido e/ou função prejudicada está correlacionado com o aumento da autoimunidade [revisado em (Costantino *et al.*, 2008;

Kuhn *et al.*, 2009)]. Essa heterogeneidade observada pode ser parcialmente explicada em função dos critérios utilizados para definir a população de Treg. O grau de atividade da doença, a influência da terapia com imunossuppressores e aspectos técnicos, como a análise no citômetro de fluxo, podem contribuir para a divergência dos achados. Anormalidades nestas células podem conduzir a hiperatividade de células T e B nos pacientes com LES (Bonelli *et al.*, 2009; Horwitz, 2010; Liu *et al.*, 2004; Yates *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008b).

Em uma análise detalhada, Miyara *et al.* relataram que a disfunção no controle da sobrevivência de Tregs poderia conduzir a sua depleção *in vivo* e que estas células expressam altos níveis de Fas na sua superfície, sugerindo que o aumento da sensibilidade de Treg à apoptose mediada por CD95 (Fas) pode explicar a perda destas células em pacientes com LES ativo. Sendo assim, a indução inapropriada de apoptose de Treg (**Figura 4**), seguindo de exposição de autoantígenos durante o curso da doença são considerados fatores relevantes na patogênese do LES e, por essa razão, motivaram a execução deste trabalho. (Fritzsching *et al.*, 2005; Miyara *et al.*, 2005). Dessa forma, é importante determinar se as Treg isoladas de pacientes com LES expressam níveis anormais de fatores pro e antiapoptóticos já descritos (Gavin *et al.*, 2002). Igualmente interessante, seria avaliar ainda se esta propensão anormal à apoptose induzida por Fas pode ser revertida depois da expansão *in vivo* (Vigouroux *et al.*, 2004).

Portanto, conhecimentos específicos sobre os mecanismos celulares e moleculares relacionados à frequência e função de Treg em diferentes doenças humanas necessitam ser obtidos, com o objetivo de melhorar futuras estratégias terapêuticas baseadas nessa importante subpopulação celular [revisado em (Costantino *et al.*, 2008; Kuhn *et al.*, 2009)].

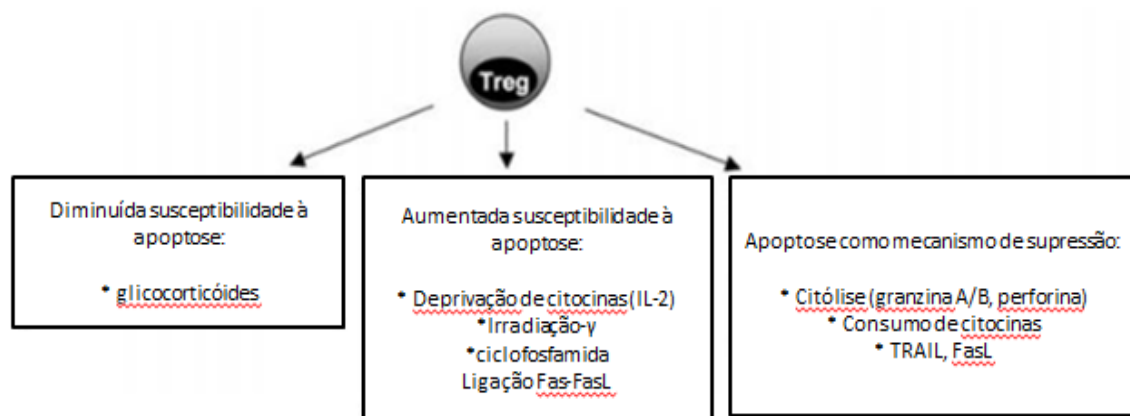


Figura 4: Homeostase e apoptose de células Treg. A apoptose influencia a sobrevivência de células Treg e sua função em vários níveis. A susceptibilidade à apoptose de Treg em resposta à glicocorticoide é diminuída, mas aumentada em resposta à deprivação de citocinas, irradiação- γ , ciclofosfamida e interação Fas-FasL, quando comparadas às convencionais células T CD4⁺. Além disso, as células Treg medeiam a supressão de respostas imunes, em parte, pela indução de apoptose (citólise, consumo de citocinas ou de expressão de ligantes DR) (Adaptado de Tischner *et al.*, 2012). DR: *death receptor*. FasL: ligante de Fas. IL-2: interleucina-2. TRAIL: *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*.

1.6 Apoptose

A apoptose é um processo de morte celular programada altamente regulado e representa uma parte vital do crescimento e diferenciação em todos os tecidos, sendo um evento crítico para a função biológica normal dos organismos multicelulares. É parte do desenvolvimento embrionário, seleção de células T e B, eliminação de linfócitos potencialmente autorreativos na periferia e manutenção da homeostase dos linfócitos através da morte celular induzida por ativação. Evidências sugerem que eventos celulares e moleculares específicos para a apoptose podem manter a tolerância imunológica, mas também gerar autoantígenos responsáveis pelo desenvolvimento inicial e pela perpetuação de condições autoimunes. Durante a apoptose, as células sofrem alterações morfológicas e moleculares que incluem redistribuição de autoantígenos na superfície celular, clivagem de antígenos próprios por proteases intracelulares e fosforilação de autoantígenos por quinases específicas. Normalmente, os fagócitos irão remover rapidamente células em apoptose, antes que elas possam liberar seus conteúdos modificados. No LES, os processos de apoptose e/ou *clearance* de material apoptótico pode estar prejudicado, o que faz com que

autoantígenos nucleares modificados sejam expostos ao sistema imune e reconhecidos como antígenos não próprios ou como um sinal perigoso (Munoz *et al.*, 2008; Navratil & Ahearn, 2001; Salmon & Gordon, 1999; Xue *et al.*, 2006).

Os mecanismos fundamentais de apoptose e dos genes que a controlam são altamente conservados entre as diversas espécies, dos vermes ao homem (Salmon & Gordon, 1999). A apoptose é regulada por diferentes vias envolvendo genes que promovem ou inibem este processo (Chen *et al.*, 2007). Entre as moléculas de importância fundamental para a apoptose estão os receptores de morte e seus ligantes específicos, bem como as proteínas reguladoras dos seus respectivos genes (Kohler & Petzl-Erler, 2006). Existem duas vias principais envolvidas na apoptose: a via extrínseca, controlada pela superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNF) e ativada pela ligação dos receptores de morte; e a via intrínseca, controlada pelos membros da família Bcl-2 (linfoma de célula B do tipo 2) e mediada pela mitocôndria (**Figura 5**) (Bengtsson *et al.*, 2008; Liphaut & Kiss, 2010). Quando os receptores de morte, como Fas e o receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1) são vinculados aos seus ligantes, Fas ligante (FasL) ou TNF, a apoptose pode ocorrer. Após a ligação de FasL à Fas, o domínio de morte associado à proteína adaptadora Fas (FADD) é recrutado e este complexo, por sua vez, recruta a pró-caspase 8, com subsequente autoativação. A caspase 8 pode clivar diretamente a caspase 3, que inicia a cascata de morte. A caspase 8 também pode ativar a via intrínseca, mediada pela liberação de citocromo c via tBid (proteína proapoptótica de domínio BH3-*only* agonista da morte celular) a partir da mitocôndria. A via intrínseca é ativada passivamente, devido à ausência de sinais de sobrevivência essenciais. Todas as células do corpo requerem sinais contínuos positivos para permanecerem vivas. No caso dos linfócitos T, por exemplo, esses sinais incluem IL-2 e interferon- β (IFN- β), que atuam *up*-regulando a expressão de moléculas antiapoptóticas, tais como Bcl-2 e a proteína antiapoptótica de linfoma de célula B extra grande (Bcl-x_L). Essas moléculas impedem a liberação do citocromo c a partir da mitocôndria. Quando essa via é ativada, na ausência de um sinal positivo para a sobrevivência, a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP) é alterada, permitindo a liberação de proteínas intermembranares, como o citocromo c, que juntamente com Apaf-1 (Fator de ativação de apoptose 1) constitui o apoptossomo, o qual recruta e ativa a caspase 9. Esta, por sua vez, cliva e ativa as caspases

executadoras, iniciando a morte celular. MOMP é regulada por membros da família Bcl-2 (Bengtsson *et al.*, 2008; Salmon & Gordon, 1999).

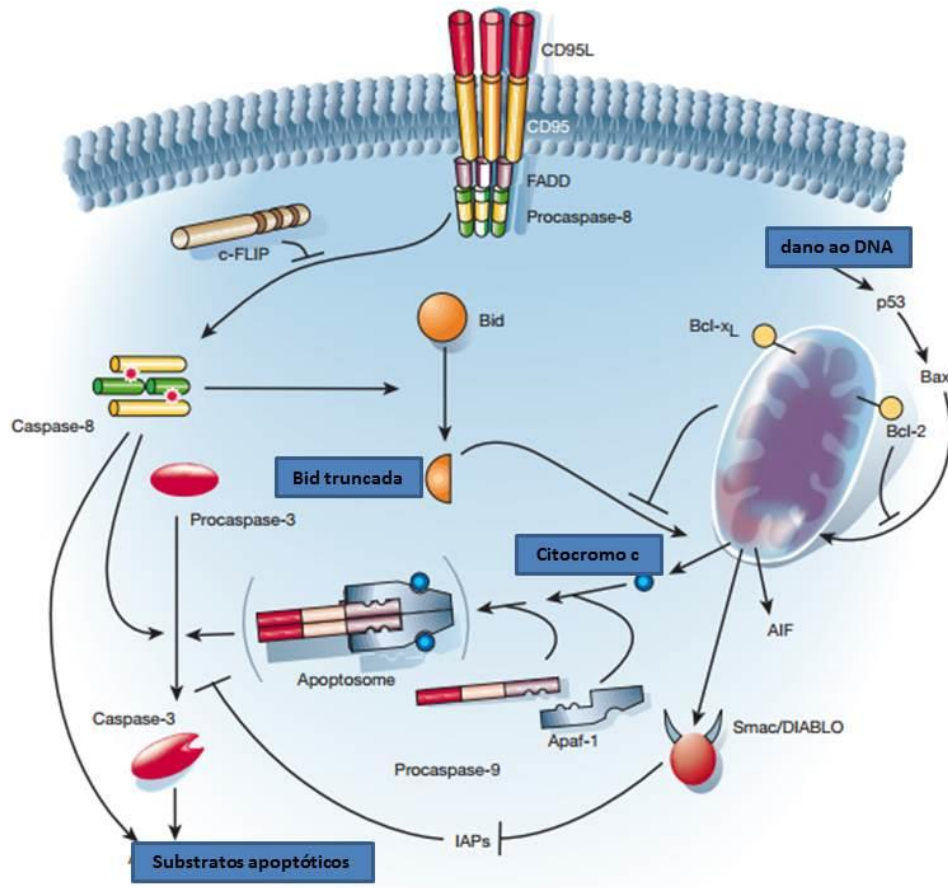


Figura 5: As duas principais vias apoptóticas em células de mamíferos. A via ativada pelos receptores de morte e seus ligantes (topo) a via mitocondrial de apoptose (à direita). As duas vias operam independentemente uma da outra (Adaptado de Hengartner, 2000). AIF: Flavoproteína. Apaf-1: *Apoptotic protease activating factor 1*. Bax: proteína proapoptótica de domínio BH3-only promotora de morte associada à Bcl-2. Bcl-2: proteína 2 de linfoma de célula B. Bcl-xL: proteína antiapoptótica de linfoma de célula B extra grande. Bid: proteína proapoptótica de domínio BH3-only agonista da morte celular. c-FLIP: *FLICE-like inhibitory protein*. DIABLO: *direct IAP-binding protein with low Pi*. FADD: *Fas-associated death domain protein*. IAPs: *Inhibitors of apoptosis proteins*. Smac: *second mitochondria-derived activator of caspases*.

O LES é uma doença autoimune dependente de autoantígeno dirigido à célula T. Tanto um aumento ou atraso na apoptose, quanto um reduzido *clearance* de células apoptóticas (que não são mutuamente excludentes) levam a um aumento da exposição de nucleossomos ao sistema imune, os quais serão identificados como autoantígenos muito importantes. Isto gera células T específicas contra nucleossomos e anticorpos antinucleossomo, causando lesões nos órgãos (**Figura 6**). Recentemente, tem-se proposto que a resposta imune anormal está associada com a anormalidade na apoptose de linfócitos em pacientes com LES. A apoptose acelerada pode ser uma consequência direta de alterações nos genes/proteínas relacionadas à morte celular programada, como Fas e Bcl-2. Alterações destas proteínas podem gerar um status pró-inflamatório, conduzindo ao lúpus (Bengtsson *et al.*, 2008; Liphaut & Kiss, 2010; Munoz *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2006).

A relação entre indutores e inibidores da apoptose pode variar de acordo com o tipo de célula, doença autoimune e a idade de início da doença (Liphaut *et al.*, 2006).

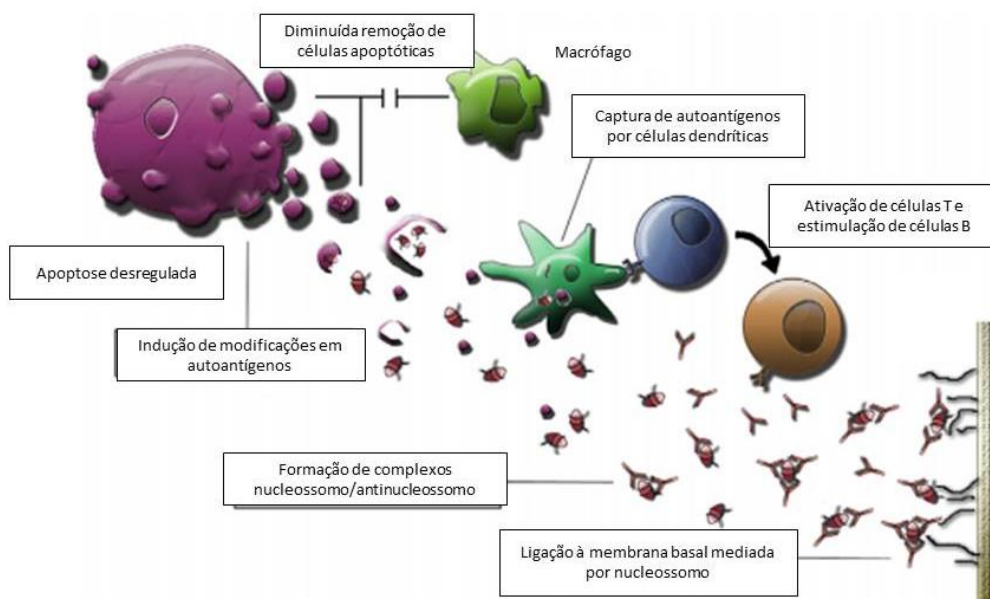


Figura 6: Hipótese geral para a ocorrência do LES. Apoptose desregulada e/ou remoção insuficiente de células apoptóticas conduz à liberação de autoantígenos (exemplo: nucleossomos) na circulação. Isso conduz à ativação de células apresentadoras de antígenos, uma resposta autoimune mediada por célula T, e a formação de imunocomplexos que induz glomerulonefrite, por exemplo (Adaptado de Munoz *et al.*, 2008).

1.6.1 Sistema Fas/FasL

Em circunstâncias imunológicas normais, a atividade contra antígenos próprios é impedida por vários mecanismos, incluindo a via Fas de apoptose, que está envolvida no processo de tolerância imunológica pela deleção de células T autorreativas indesejáveis e células B. A importância da apoptose na tolerância imunológica foi definida em um estudo de defeitos genéticos em *FAS* e no seu ligante (*FASL*) em modelos de camundongos com LES humano. A via apoptótica mediada por Fas é bem descrita na tolerância periférica. O complexo Fas/APO-1 (antígeno de apoptose 1 – CD95) foi inicialmente caracterizado como uma molécula de superfície celular que poderia regular o crescimento de linfócitos malignos. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais contra tumores conduziu a descoberta de duas moléculas denominadas APO-1 e Fas. Após a observação de que as duas moléculas possuíam sequências idênticas, foi dada a designação CD95 (Nagata & Suda, 1995; Trauth *et al.*, 1989; Varadhachary & Salgame, 1998; Yonehara *et al.*, 1989). Fas é um membro da superfamília do fator de necrose tumoral e do fator de crescimento de nervo, e é expressa em muitas células, enquanto que seu ligante FasL (CD95L) é expresso em células T ativas, células NK e sítios imunologicamente privilegiados (Mohammadzadeh *et al.*, 2011; Sahebari *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2006). A forma solúvel da proteína Fas (sFas) é originada do *splicing* alternativo do RNAm, e codifica uma molécula de Fas sem o domínio transmembranar. Esta forma pode ligar-se a FasL, bloqueando a apoptose mediada por Fas (Blanco-Colio *et al.*, 2007). A forma solúvel de FasL (sFasL) pode ser gerada por vários mecanismos independentes, incluindo *splicing* diferencial e clivagem proteolítica, e após a sua ligação ao receptor Fas ocorre a indução da apoptose celular (Janssen *et al.*, 2003; Movassagh & Foo, 2008). O mais importante ativador do receptor Fas é o FasL. A interação de FasL nas células efectoras com o seu receptor Fas nas células alvo induz um sinal de morte por apoptose nestas células. Essa interação ocorre em pelo menos três processos fisiológicos: deleção periférica de linfócitos T maduros ativados após a resposta imune, eliminação de células neoplásicas ou infectadas com vírus e eliminação de células inflamatórias em sítios imunoprivilegiados (Liphaus, 2005). As proteínas Fas e FasL são fatores essenciais na morte celular induzida por ativação, e qualquer disfunção neste sistema conduzirá a uma perturbação na tolerância periférica. O aumento da expressão do antígeno Fas de membrana, por exemplo, pode intensificar a

exposição de antígenos ocultos e induzir o fenômeno autoimune (Liphaus & Kiss, 2010; Sahebari *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, revelou-se que os genes *FAS* e *FASL* têm um importante papel na artrite reumatóide, LES e outras doenças autoimunes, as quais podem estar associadas a apoptose anormal nas células T (Lee *et al.*, 2001a; Mohammadzadeh *et al.*, 2011). Mutações nos genes *FAS*, *FASL*, e nos genes das caspases 8 e 10 também podem resultar na síndrome linfoproliferativa autoimune [revisado em (Kohler & Petzl-Erler, 2006)]. Um estudo encontrou um aumento da expressão de Fas em linfócitos B de pacientes com LES, o que está relacionado ao estado de ativação dos linfócitos e se correlaciona com a atividade da doença. O aumento da expressão de Fas resulta em uma maior susceptibilidade à apoptose mediada por Fas, podendo contribuir para o aumento dos níveis de linfócitos apoptóticos nos pacientes com LES (Bijl *et al.*, 2001). Um estudo Japonês indicou que *FASL* é regulado positivamente em pacientes com LES ativo, e que corticosteróides promovem uma regulação negativa da expressão gênica de *FASL* (Feng, 1997).

O gene *FAS*, em humanos, está localizado no cromossomo 10q24.1 e consiste de nove éxons e oito íntrons. Dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) foram relatados na região promotora: a transição G→A na posição -1377 (rs2234767), que altera estruturalmente o sítio de ligação do fator de transcrição da Proteína estimulatória 1; e a transição A→G na posição -670 (rs1800682), que está localizada no sítio de ligação do fator de transcrição STAT1. Estes dois polimorfismos podem desregular a atividade promotora e afetar a expressão do gene *FAS*, podendo contribuir para diversas doenças autoimunes (Broen *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). Já foi relatado que o polimorfismo *FAS* -670A>G confere susceptibilidade ao LES, esclerose sistêmica, sarcoidose e hepatite autoimune (Broen *et al.*, 2009). O gene *FASL*, que codifica o ligante de Fas, está mapeado no cromossomo 1q23 e compreende quatro éxons. Dois importantes polimorfismos descritos nesse gene, na região promotora (-844T→C, rs763110) e no íntron 2 (INV2nt_124A→G, rs5030772), parecem exercer um efeito fundamental na regulação e expressão de *FASL*. Visto que a substituição na posição -844 foi identificada no motivo putativo de ligação para um fator de transcrição (proteína β intensificadora de ligação a CCAAT), o alelo -844C pode estar relacionado com o aumento da expressão de FasL. (Mohammadzadeh *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2009).

1.6.2 Proteínas da família Bcl-2

A família Bcl-2 é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte celular por apoptose (Borner, 2003). Os membros da família Bcl-2, como Bcl-2 e Bcl-xL, inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c e são chamados de reguladores antiapoptóticos. Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas (Hengartner, 2000). Interações entre os membros pró- e anti-apoptóticos definem se uma célula deve ou não morrer (Borner, 2003). Entre as proteínas mais bem caracterizadas e estudadas desta família estão a Bax e a Bcl-2.

O primeiro gene antiapoptótico descrito foi *BCL-2*, identificado em linfoma folicular de células B. Está localizado no cromossomo 18q21.3 e consiste de 3 éxons e 2 promotores (Nuckel *et al.*, 2007; Tsujimoto *et al.*, 1985). A proteína Bcl-2 se localiza entre as membranas interna e externa da mitocôndria, na membrana nuclear e no retículo endoplasmático e inibe a apoptose através da heterodimerização com membros pró-apoptóticos e através da formação de canais que estabilizam a membrana mitocondrial, impedindo a liberação do citocromo c e o ativador secundário de caspases derivado da mitocôndria. Assim, essa proteína desempenha um papel fundamental na regulação da apoptose em diversos tipos celulares, incluindo células T e B humanas (Brown, 1997; Lippman & Kiss, 2010; Starczynski *et al.*, 2005).

Especula-se que SNPs em *BCL-2*, que alteram a função e/ou expressão da proteína, poderiam exercer um impacto sobre o delicado equilíbrio dos mecanismos reguladores da apoptose. O SNP Ala43Thr (G127A, rs1800477), no éxon 2, já foi associado com um aumento da resistência a doenças autoimunes em uma população japonesa, e resulta em uma função antiapoptótica diminuída em linhagens de pré-células B *in vitro*. No entanto, este SNP é raro na população euro-descendente. Análises haplotípicas mostraram um desequilíbrio de ligação significativo entre um SNP inibitório no promotor P2 (-938C>A, rs2279115) e um SNP silencioso no éxon 1 (+21A>G, rs1801018). Entretanto, as possíveis implicações funcionais destes alelos ainda não foram bem definidas. Um estudo mostrou que o genótipo *BCL-2* -938AA foi associado à expressão aumentada de Bcl-2 e é um marcador genético desfavorável em pacientes com leucemia linfocítica crônica de células B (Komaki *et al.*, 1998; Nuckel *et al.*, 2007). Por outro lado, tem-se especulado que o genótipo variante AA pode render uma melhor interação com a p53, conduzindo à expressão diminuída de Bcl-2 e menor longevidade de células transformadas, diminuindo o

risco de desenvolvimento de câncer. A superexpressão desta proteína em camundongos transgênicos protege as células B contra a morte celular, conferindo maior sobrevivência às células e promovendo o desenvolvimento de uma síndrome autoimune semelhante ao lúpus, com nefrite e autoanticorpos, como anti-dsDNA e anti-Sm (Chen *et al.*, 2007; Strasser *et al.*, 1991b). A expressão dessa proteína em linfócitos isolados de pacientes com LES também tem sido uma questão controversa. Uma investigação relatou aumento da expressão de Bcl-2 em células T, mas não em células B, enquanto que outro estudo demonstrou expressão diminuída da proteína em linfócitos de pacientes com LES ativo (Aringer *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1997). Além disso, a expressão aumentada de Bcl-2 também foi observada em células TCD8⁺ de pacientes com lúpus que são resistentes à terapia com esteróides. Estudos como este podem fornecer estratégias importantes para estratificar pacientes para a intervenção terapêutica (Seki *et al.*, 1998).

A proteína X associada ao Bcl-2 (Bax) é uma proteína intracelular pró-apoptótica necessária para o estímulo de morte celular intrínseca, e constitui parte da maquinaria que controla tanto a seleção de linfócitos do timo, quanto a homeostase linfóide periférica. Bax foi isolada como uma proteína de ligação à Bcl-2 em experimentos de imunoprecipitação, pois co-imunoprecipitava com Bcl-2, bloqueando sua atividade (Borner, 2003; Brown, 1997; Kohler & Petzl-Erler, 2006). Após receber um estímulo apoptótico, Bax é translocada do citoplasma e se insere na membrana mitocondrial, podendo causar a liberação do citocromo c, embora o mecanismo deste processo ainda não esteja bem esclarecido (Kohler & Petzl-Erler, 2006). Em alguns modelos animais e linhagens de células tumorais, a proteína Bax mostrou ser supressora de tumor que estimula a apoptose *in vivo* (Yin *et al.*, 1997). Essa proteína pode homodimerizar ou heterodimerizar com Bcl-2 ou Bcl-xL para reverter seus efeitos antiapoptóticos e promover a apoptose. As taxas de Bcl-2:Bax e Bcl-xL:Bax parecem ser importantes determinantes da apoptose. Altas taxas de Bcl-2 e Bcl-xL em relação à Bax favorecem a sobrevivência da célula, enquanto o contrário promove a morte celular (Aggarwal & Gupta, 1998). Um estudo de 2003 relatou uma expressão diminuída da proteína Bax em linfócitos de pacientes com artrite reumatóide, o que pode contribuir para a expansão de uma subpopulação de linfócitos CD4⁺ ativados e, portanto, contribuir para a manutenção de clones de células T autorreativas periféricas nestes pacientes. Os autores revelaram também uma relação entre

defeitos na apoptose de linfócitos *in vitro* e a atividade clínica da doença (Szodoray *et al.*, 2003).

O gene *BAX* humano foi mapeado no cromossomo 19q13.3-q13.4, possui 6 éxons e a região promotora contém 4 motivos com homologia aos sítios consenso de ligação à proteína p53. Ensaio envolvendo a região promotora de ambos os genes (*BAX* e *p53*) sugeriram que *BAX* é ativado pela proteína p53 (Chen *et al.*, 2007; Miyashita & Reed, 1995). Vários polimorfismos foram identificados no gene *BAX* nos últimos anos. A transição -248G>A (rs4645878), localizada na região promotora, aparentemente resulta em variabilidade funcional. O alelo -248A está associado com expressão diminuída da proteína, progressão clínica e resistência ao tratamento em leucemia linfocítica crônica. A eficiência apoptótica pode estar reduzida em indivíduos com este alelo (Fegan *et al.*, 2006; Saxena *et al.*, 2002). No entanto, os resultados de um estudo brasileiro com a doença autoimune Pênfigo Foliáceo mostraram que, embora as variantes alélicas de *BAX* -248G>A diferem funcionalmente, esta variação não altera a funcionalidade das moléculas de forma que possam interferir com o desenvolvimento da doença em questão (Kohler & Petzl-Erler, 2006). Certos SNPs nos promotores dos genes *BAX* e *BCL-2* são particularmente interessantes, pois estão localizados dentro do elemento de ligação à p53 na região promotora de *BAX* e do elemento responsivo à p53 no promotor de *BCL-2*. Então, estes SNPs podem afetar a interação entre a proteína p53 e as suas sequências reguladoras nos promotores destes genes (Chen *et al.*, 2007).

1.6.3 Proteína p53

A proteína supressora de tumor p53 é ativada em resposta ao dano no DNA e é determinante na resposta apoptótica. A p53 atua na regulação da expressão, localização celular e atividade de efetores-chave de processos celulares, tais como o reparo do DNA, parada do ciclo celular, senescência e apoptose. Esta proteína bloqueia o ciclo celular nas fases G1 e G2 e assim pode iniciar a apoptose pela indução da expressão de genes pró-apoptóticos, incluindo *BAX* e *FAS*, ou reprimir genes antiapoptóticos, como *BCL-2*. A p53 é um fator de transcrição que pode se ligar diretamente no elemento de ligação à p53 no promotor de *BAX* e induzir sua expressão, enquanto que pode inibir a transcrição de *BCL-2* através de uma região responsiva no promotor deste gene (Chen *et al.*, 2007; Grochola *et al.*, 2010). A proteína p53 é codificada pelo gene *TP53*, considerado o mais comumente

alterado em cânceres humanos, o que resulta em uma mudança quantitativa e/ou qualitativa da proteína (Zhuo *et al.*, 2009). O gene *TP53* foi mapeado no cromossomo 17 através do uso de um clone de cDNA para análise de células híbridas murinas e humanas. Posteriormente, o loco para *TP53* foi identificado na porção telomérica do braço curto deste cromossomo (17p13.1) (McBride *et al.*, 1986).

Já foi relatado que pacientes com LES com maior índice de atividade da doença apresentam níveis mais elevados da proteína p53 no sangue periférico. Estudos têm sugerido que as variações genéticas na via p53, que resultam em alterações sutis na função apoptótica da proteína, poderiam estar associadas com a susceptibilidade ou severidade do LES (Lee *et al.*, 2005; Onel *et al.*, 2009; Sanchez *et al.*, 2006). Inúmeros polimorfismos já foram descritos no gene *TP53* humano, os quais são capazes de influenciar direta ou indiretamente as rotas metabólicas nas quais a proteína p53 atua. O polimorfismo mais estudado neste gene, até o momento, localiza-se no éxon 4 do códon 72 e consiste de uma substituição do aminoácido prolina por arginina devido a uma troca de guanina por citosina na posição 12139 de *TP53* (Pro72Arg, rs1042522). Este polimorfismo ocorre em um domínio rico em prolina, que é necessário para a proteína induzir a apoptose. Em uma análise do potencial apoptótico das duas variantes do códon 72 de *TP53*, notou-se que a molécula que apresenta arginina induz a apoptose marcadamente melhor do que a molécula com prolina. Portanto, sugeriu-se que a variação interindividual na resposta apoptótica pode estar correlacionada com o polimorfismo Pro72Arg. Os dados indicam que uma fonte deste realçado potencial apoptótico é a maior habilidade da variante Arg72 para localizar a mitocôndria. Essa localização é acompanhada pela liberação de citocromo c para o citosol. (Dumont *et al.*, 2003; Kohler & Petzl-Erler, 2006).

Um estudo publicado em 2007 relatou que o risco de carcinoma de células escamosas da cabeça e do pescoço pode estar associado com SNPs nos promotores de *BAX* e *BCL-2*, particularmente entre heterozigotos *TP53* Arg72Pro, sugerindo que estes polimorfismos podem, conjuntamente, contribuir para o risco de câncer (Chen *et al.*, 2007). Um estudo recente, que avaliou coreanos com LES, sugeriu que indivíduos com o alelo Pro72 podem ter um risco maior de desenvolver a doença do que aqueles com o alelo Arg72. Porém, não houve associação significativa deste SNP com as manifestações clínicas/sorológicas da doença (Lee *et al.*, 2005). A associação deste polimorfismo com a susceptibilidade ao LES não foi encontrada em um estudo similar realizado com pacientes

lúpicos da Espanha (Sanchez *et al.*, 2006). Em poleneses, uma investigação encontrou uma fraca contribuição do genótipo Arg/Arg para a morbidade do LES. Os autores ressaltaram ainda que a distinção dos resultados entre várias populações pode ser devido a diferenças na composição étnica e/ou à exposição a diferentes fatores ambientais que produzem um impacto distinto dos genótipos *TP53 Pro72Arg* na incidência do LES (Piotrowski *et al.*, 2008). Análises de associação deste SNP com outras doenças autoimunes revelaram um aumento da frequência de homozigotos Pro72 entre pacientes com artrite crônica juvenil (Taubert *et al.*, 2000). No entanto, não foi encontrada associação com pênfigo foliáceo endêmico, artrite reumatóide e doença de Alzheimer (Kohler & Petzl-Erler, 2006; Lee *et al.*, 2001b; Rosenmann *et al.*, 2003).

CAPÍTULO 2

JUSTIFICATIVAS

CAPÍTULO 2 - JUSTIFICATIVAS

Considerando que o LES é um grave problema de saúde que afeta pessoas no mundo todo e que, devido ao seu caráter multifatorial, muitas questões sobre a doença ainda permanecem sem resposta, diversos trabalhos estão engajados na tentativa de identificar os possíveis fatores envolvidos na sua ocorrência e progressão. Embora a apoptose seja um fator já bem aceito para o desenvolvimento do LES, ainda não está bem esclarecido (se e) como anormalidades observadas nas vias apoptóticas podem desencadear a autoimunidade. Estudos das alterações na expressão de genes/proteínas apoptóticas podem ser importantes não somente para o entendimento da etiopatogênese do LES, mas também para contribuir no desenvolvimento de novas terapias. O conhecimento do papel dos componentes da apoptose no LES poderia conduzir ao desenvolvimento de terapias mais direcionadas, resultando em uma resposta mais específica e efetiva quando comparada à imunossupressão global. Porém, os estudos que avaliam os produtos de variantes gênicas e a possível influência da apoptose desregulada no LES são limitados e os resultados são, muitas vezes, controversos. A maioria deles aborda somente um ou alguns elementos envolvidos nas vias de apoptose independentemente, o que dificulta uma visão global da desregulação apoptótica que influencia a patogênese da doença. Baseados nestas informações e considerações feitas, realizamos uma ampla investigação imunogenética em pacientes com LES, a fim de elucidar os diferentes mecanismos moleculares e imunológicos envolvidos na desregulação apoptótica que podem influenciar o desenvolvimento a doença.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

CAPÍTULO 3 - OBJETIVOS

Diante das considerações citadas anteriormente, este estudo propõe a caracterização imunogenética de pacientes com LES e indivíduos controle, através de diferentes abordagens envolvendo genes e proteínas apoptóticas, juntamente com os dados clínicos dos pacientes. Essa ampla análise buscou a identificação dos possíveis fatores genéticos e imunológicos e sua implicação na desregulação apoptótica que influencia a patogênese do LES. Para isto, delineamos os objetivos específicos descritos a seguir:

I. Estudar a frequência dos polimorfismos -1377 G>A e -670 A>G do gene *FAS*; -844 T>C e INV2nt 124 A>G do gene *FASL*; -938 C>A do gene *BCL-2* e -248 G>A do gene *BAX* em uma população de pacientes com LES e comparar com controles saudáveis;

II. Avaliar quantitativamente a apoptose inicial e a morte celular de linfócitos, utilizando o método de Anexina V e o corante nuclear 7-AAD (7-Amino-Actinomicina-D), em pacientes com LES e comparar com controles saudáveis;

III. Avaliar a frequência de células T regulatórias $CD4^+CD127^{low}CD25^{high}Foxp3^+$ em mulheres lúpicas, comparando com mulheres saudáveis.

IV. Analisar a frequência de diferentes subtipos de células T (T $CD4^+$, T $CD8^+$ e T regulatórias $CD4^+CD127^{low}CD25^{high}Foxp3^+$) expressando proteínas reguladoras da apoptose Fas, FasL, Bcl-2, Bax e p53, em mulheres lúpicas e comparar com mulheres saudáveis, buscando possíveis associações com o quadro clínico e tratamento estabelecido;

V. Determinar a expressão do RNAm dos genes *FAS*, *FASL*, *BAX*, *BCL-2* e *TP53* em um grupo de mulheres com LES, comparando com a expressão dos mesmos em mulheres saudáveis.

VI. Buscar relação entre os dados encontrados, bem como relacionar as frequências dos polimorfismos genéticos estudados com possíveis associações clínicas e laboratoriais dos pacientes com LES.

CAPÍTULO 4 - ARTIGO 1

Evaluation of polymorphic variants in apoptotic genes and their role in susceptibility and clinical progression to Systemic Lupus Erythematosus in southern Brazilian patients

Nadine Glesse¹, Priscila Vianna¹, Lia Mara Gomes Paim³, Maria Cristina Cotta Matte¹, Ana Karine Kramer de Aguiar¹, Pâmela de Lara Palhano¹, Odirlei André Monticielo², João Carlos Tavares Brenol², Ricardo Machado Xavier², José Artur Bogo Chies¹.

¹Laboratory of Immunogenetics, Institute of Biosciences, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ²Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. ³Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

Artigo científico submetido à revista *Lupus*.

EVALUATION OF POLYMORPHIC VARIANTS IN APOPTOTIC GENES AND THEIR ROLE IN SUSCEPTIBILITY AND CLINICAL PROGRESSION TO SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS IN SOUTHERN BRAZILIAN PATIENTS

Nadine Glesse¹, Priscila Vianna¹, Lia Mara Gomes Paim³, Maria Cristina Cotta Matte¹, Ana Karine Kramer de Aguiar¹, Pâmela de Lara Palhano¹, Odirlei André Monticielo², João Carlos Tavares Brenol², Ricardo Machado Xavier², José Artur Bogo Chies¹.

¹Laboratory of Immunogenetics, Institute of Biosciences, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ²Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. ³Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author:

Dr. José Artur Bogo Chies. Email Address: jabchies@terra.com.br

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Laboratory of Immunogenetics. Institute of Biosciences, Department of Genetics.

Bento Gonçalves Avenue – 9500, Campus do Vale. 91501970

Porto Alegre, RS – BRAZIL. PO BOX 15053

Phone: +55 51 3308 6740; Fax: +55 51 3308 7311

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease marked by the disruption of the immune homeostasis. Patients exhibit a wide range of clinical manifestations and environmental and genetic factors are involved in SLE pathogenesis. Evidences suggest that abnormalities in the cellular and molecular events that coordinate apoptosis may favor the generation of autoantigens, involved in autoimmunity. In this way, the apoptotic deregulation may be affected by polymorphic variants in apoptotic-related genes. We analyzed *FAS*, *FASL*, *BCL-2* and *BAX* polymorphisms in order to correlate to SLE susceptibility and clinical features. 427 SLE patients from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and 543 controls from southern Brazil were evaluated. We observed higher frequencies of the *FASL* -844CC genotype and -844C allele, as well as of the *FASL*-844C/*IVS2nt-124A* haplotype in African-derived SLE patients when compared to controls ($p < 0.001$). *FASL* -844C, which is related to high FasL expression, could contribute to increased apoptosis and to the breakdown of immunological tolerance, favoring autoantibodies production and inflammation. On the other hand, the *BAX* -248GA genotype and the -248A allele, related to low protein expression, were observed as a protective factor against SLE in this same population. In conclusion, our data support a role for apoptosis related gene polymorphisms in SLE susceptibility.

Keywords: systemic lupus erythematosus, apoptosis, Fas/FasL pathway, Bcl-2, genetic polymorphisms.

INTRODUCTION

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a complex autoimmune inflammatory disorder that presents a wide range of clinical manifestations and organ damage [1-3]. This disease is characterized by loss of immunological tolerance resulting in autoantibody production against intracellular antigens. The deposition of immune complexes in tissues followed by the subsequent activation of the complement system induces serious inflammatory conditions [3, 4]. SLE predominantly affects women, with a peak around 30 years of age and the rate of women to men is 9:1 [2, 5, 6]. Further, the SLE prevalence differs according to the ethnic origin of the evaluated patients, and is higher in African-American, African-Caribbean, Native American, Indian, Polynesian and Chinese populations when compared to European-derived populations [7].

In healthy individuals, most of the autoreactive T and B cells are deleted by the process of central tolerance. However, in SLE patients autoreactive cells persist generating a variety of autoantibodies [8, 9]. Apoptosis has attracted the attention of researchers since it can potentially be a major source of autoantigens in SLE [10, 11]. Apoptosis is critical in normal physiological processes of multicellular organisms, being essential for T and B lymphocytes selection and the regulation of immune responses [12]. A disbalance in this process and/or defects in the clearance of apoptotic cells can contribute to an excess of cell debris, leading to the formation and consequent tissue deposition of immune complexes [10, 13-15]. In addition, these defects may be responsible for the initial development of autoimmune conditions as well as by its perpetuation [8, 11, 16].

Apoptosis is regulated by different pathways that involve inhibitory and activating genes [17]. In normal circumstances, an immune response against self-antigens is prevented by mechanisms of apoptosis mediated by the Fas/FasL pathway [18], that also

play important roles in T cell tolerance and B cell homeostasis [19, 20]. Genetic defects in *FAS* and *FASL* genes highlight the importance of apoptosis in immune tolerance [3, 21]. Thus, *FAS* and *FASL* genes potentially play important roles in rheumatoid arthritis, SLE and other autoimmune diseases, probably due to abnormal apoptosis of T cells [22-24]. The Bcl-2 family comprises a variety of repressor and activating proteins that regulate apoptosis. Interactions between pro and antiapoptotic members define whether a cell must survive or die [25]. The Bcl-2 protein plays a role in the regulation of apoptosis in several cell types including human T and B cells [26, 27]. This protein inhibits apoptosis through heterodimerization with proapoptotic members. The overexpression of Bcl-2 in transgenic mice protects B cells against apoptosis, improving survival of cells and promoting the development of a lupus-like autoimmune syndrome, nephritis, and autoantibodies production, such as anti-dsDNA and anti-Sm [28]. Bax is a proapoptotic intracellular protein required for intrinsic cell death stimulus, controlling both the selection of lymphocytes from the thymus as well as the peripheral lymphoid homeostasis [29]. This protein can form dimers with Bcl-2 or Bcl-xL to reverse its antiapoptotic effects and promote apoptosis [30].

Since the maintenance of peripheral immune tolerance is achieved by the balance between inducers and inhibitors of apoptosis, disturbances in this system may be involved in the trigger of an autoimmunity condition. In this way, polymorphic variants in *FAS*, *FASL*, *BCL-2* and *BAX* genes could be potential candidates for SLE susceptibility. There are no studies investigating the joint genetic contribution of these genes in SLE. Moreover, few studies have ever examined the importance of these genes individually and their precise role in the pathogenesis of SLE is still controversial [3, 22, 31, 32]. Therefore, the aim of the present work was to investigate the presence and frequency of *FAS* -670, *FAS* -

1377, *FASL -844*, *FASL IVS2nt-124*, *BCL-2 -938* and *BAX -248* polymorphic variants in Southern Brazilian SLE patients and healthy controls, seeking for possible associations among these polymorphisms and lupus susceptibility as well as clinical and laboratory characteristics of patients.

MATERIALS AND METHODS

Study samples

We recruited a total of 427 SLE patients at the Division of Rheumatology from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and 543 healthy blood donors. Patients and controls were classified as European-derived or African-derived according to their phenotypic characteristics. Data about ethnicity of parents and grandparents were reported by the participants. The issue concerning skin color-based classification criteria used in Brazil is well documented and it has been already assessed by our group in previous studies [33, 34]. Information about demographic, clinical and laboratory features of SLE patients were collected from medical records filled in the Medical Archive Service and Health Information (Table 1). The diagnostic criteria for SLE were based on the classification proposed by the American College of Rheumatology (ACR) [35]. SLE patients were also evaluated for the presence of Sjögren's Syndrome and Secondary Antiphospholipid Syndrome (APS), according to the classification criteria proposed for both diseases [36, 37]. SLICC (systemic lupus international collaborating clinics) damage index [38] and SLEDAI (systemic lupus erythematosus disease activity index) [39] were also performed for each patient. At the time of recruitment, written informed consent was obtained from all participants. This study was approved by the Ethics Committee of UFRGS (96.672) and HCPA (23200).

Sample collection

The DNA used for all molecular techniques was obtained from 5 mL of peripheral blood samples collected with EDTA and extracted through the Salting-out method described by Lahiri and Nurnberger [40]. DNA samples were stored at -20°C.

***FAS*, *FASL*, *BCL-2* and *BAX* Gene Polymorphic Variants Genotyping**

Molecular identification of polymorphisms was performed by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) assay. The amplification of polymorphic variants was performed separately and the fragments generated were visualized in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. Primers and PCR conditions for amplification of the *FAS* and *FASL* promoter region containing *FAS* -1377G/A, *FAS* -670A/G and *FASL* -844T/C polymorphisms were previously described by Sun *et al.* [41]. The amplified products were digested with *Bst*UI, *Scr*FI and *Bsr*DI (New England Biolabs, Beverly, MA) restriction enzymes to distinguish the *FAS* -1377G/A, *FAS* -670A/G, and *FASL* -844T/C polymorphisms, respectively. All digestion products were visualized in 8% polyacrylamide gel electrophoresis stained with ethidium bromide. For genotyping of the *FASL* *IVS2nt-124A/G* polymorphism we used the primers and PCR conditions previously described by Zhang *et al.* [42]. The amplified product was digested with *Fok*I restriction endonuclease that generated fragments, visualized in an 8% polyacrylamide gel electrophoresis stained with ethidium bromide. For amplification of the *BCL-2* -938 C/A polymorphism, the primers and PCR conditions were previously described by Zhang *et al.* [43]. The PCR products were cleaved with *Bcc*I. The *BAX* -248 G/A polymorphism genotyping was performed according to Moshynska *et al.* [44]. *Ac*iI

restriction endonuclease was used to cut the PCR product, which were visualized in 8% polyacrylamide gel electrophoresis stained with ethidium bromide.

Statistical analysis

Genotypic and allelic frequencies were estimated by direct counting. The genotypic frequencies of cases and controls were compared to Hardy–Weinberg expectations using Chi-Square tests. Genotypic and allelic frequencies of *FAS*, *FASL*, *BCL-2* and *BAX* polymorphisms were compared between patients and controls using the Chi-square test or Fisher's exact test when appropriate. The adjusted residuals and Odds Ratio (OR) estimative were also calculated. Haplotype frequencies, D' and r^2 were estimated using MATLAB 7.10 and MLocus programs [45]. Demographic, clinical and laboratorial features were compared between European-derived and African-derived SLE patients through the Chi-square test for qualitative variables and t-test or Mann–Whitney test for quantitative variables. Associations among clinical and laboratory variables of patients and the frequencies of polymorphisms were also performed through the Chi-square test (or Fisher's exact test) for qualitative variables and t-test, Mann–Whitney test and Kruskal-Wallis test for quantitative variables. Bonferroni correction was performed for multiple comparisons. All data were analyzed with SPSS software and WinPepi program. Significance level was established at $p < 0.05$ (two-tailed).

RESULTS

In this case-control study we evaluated 427 SLE patients (74.5% European-derived and 25.5% African-derived) and 543 healthy blood donors (52.7% European-derived and 47.3% African-derived) from southern Brazil. Clinical, demographic and laboratory

characteristics of SLE patients are shown in Table 1 while demographic features of the control group are shown in Table 2. The mean age of SLE patients was 47.84 ± 14.76 years and of controls was 39.02 ± 11.24 years. Among SLE patients, 91.8% of the subjects were female and almost all had positivity for ANA (99.5%). The mean age of onset of symptoms was 30.52 ± 13.42 years while the mean age at SLE diagnosis was 32.48 ± 13.62 years. The most common clinical and laboratory characteristics in SLE patients were arthritis (81.5%), hematologic disorders (76.6%), photosensitivity (74.7%) and immunologic disorders (69.3%). European-derived SLE patients presented more photosensitivity than those African-derived (79.9% vs. 59.6%, $p < 0.001$). However, African-derived patients had a higher prevalence of hematologic disorders (88.1% vs. 72.6%, $p = 0.002$), leukopenia/lymphopenia (75.2% vs. 57.9%, $p = 0.002$), anti-Ro/SSA (59.0% vs. 37.6%, $p < 0.001$) and anti-La/SSB (19.0% vs. 10.4%, $p = 0.034$) antibodies when compared to the European-derived group.

Concerning the *FAS* -1377G/A and *FAS* -670A/G polymorphisms no statistical differences were observed in the genotypic and allelic frequencies between SLE patients and controls in both ethnic groups as well as looking for the combined effects of both polymorphisms in haplotypes analysis (data not shown). Results for the *FASL* gene polymorphisms (Table 3) showed different genotypic and allelic frequencies for the *FASL* -844T/C variant between the studied groups. African-derived SLE patients had a higher frequency of CC genotype than controls (20% vs. 7%, $p < 0.001$). In addition, carriers of the CC genotype had a 4.51-times higher risk of developing SLE compared to subjects carrying the TT genotype (CI 95% 2.01 – 10.13, $p < 0.001$). Moreover, African-derived subjects carrying the CT genotype had a 1.90-fold increased risk of developing SLE (CI 95% 1.11 – 3.28, $p = 0.038$) in comparison with those carrying TT genotype. Likewise, a

higher frequency of C allele was observed in SLE African-derived patients as compared to their controls (45% vs. 29%, $p < 0.001$), with the overall OR of 2.02 for C allele (CI 95% 1.42 – 2.86) in relation to T allele. Concerning the European-derived control group, the frequencies of the *FASL* -844T/C polymorphism were not in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), avoiding further comparisons. In relation to *FASL* IVS2nt-124A/G polymorphism, genotypic and allelic frequencies did not differ between European- and African-derived cases and controls.

The studied polymorphisms in *FASL* gene are in linkage disequilibrium. Thus, we performed haplotype analyses (Table 4). Four haplotypes of *FASL* -844/*FASL* IVS2nt-124 (T/A, T/G, C/A and C/G) were observed. Our results indicated that the *FASL* -844C/*FASL* IVS2nt-124A haplotype was more frequent in African-derived patients when compared to controls (45% vs. 27%, $p < 0.001$), and that C/A haplotype carriers presented a 2.30-fold increased risk of developing SLE (CI 95% 1.58 – 3.36, $p < 0.001$) in comparison to individuals with the T/A haplotype.

With respect to genes from the intrinsic apoptosis pathway, we studied *BCL-2* -938C/A and *BAX* -248G/A polymorphisms (Table 5). *BCL-2* -938C/A genotypic frequencies in European-derived SLE patients were not under HWE. Analyses of the *BAX* -248G/A polymorphism showed significant differences in the frequencies of the GG, GA and AA genotypes as well as G and A alleles between African-derived cases and controls. Lower frequencies of GA heterozygous were observed in SLE patients when compared to their controls (19% vs. 62%, $p < 0.001$), with an OR of 0.12 in relation to individuals carrying the GG genotype (CI 95% 0.02 - 0.51, $p = 0.003$). SLE subjects had a lower frequency of A allele than controls (11% vs. 38%, $p < 0.001$; OR 0.21 CI 95% 0.08– 0.58).

Finally, we investigated a potential relationship among these *FAS*, *FASL*, *BCL-2* and *BAX* polymorphisms and clinical features of the disease (Table 6). Evaluating the damage index (SLICC) and the presence of the variants studied, we observed a possible association of the *BCL-2* -938CA genotype and SLICC in European-derived group (p=0.04). Nevertheless, the significance was lost after applying Bonferroni correction for multiple comparisons.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study that investigated the joint role of apoptotic related *FAS*, *FASL*, *BCL-2* and *BAX* gene polymorphisms in the susceptibility and pathogenesis of SLE. Since the SLE incidence and the frequencies of apoptotic-related polymorphisms vary among different populations, our sample was classified according to the ethnic origin [3, 46-50]. A previous study published by Santos *et al.* assessed individual interethnic admixture and validated the classification criteria of European-derived or African-derived subjects used in our Brazilian admixed population [51].

The two *FASL* polymorphisms evaluated (-844T → C, rs763110) and intron 2 (INV2nt_124 A → G, rs5030772) are reported to have fundamental effects on gene expression and regulation. A substitution at -844 position was identified in the binding motif for CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta), and the -844C allele was associated with increased *FASL* expression [23, 52]. Our data concerning higher frequencies of the CC genotype and of the C allele in African-derived SLE subjects, suggests a possible association of increased *FASL* expression and an elevated risk for SLE. Activated T cells expressing FasL are considered as major inducers of apoptosis in T, B and antigen-presenting cells. T cells presenting higher amounts of FasL would provide a

signal to accelerate the apoptosis through the interaction of TCR and CD28. This process contributes to an excessive lymphocyte apoptosis and an impaired clearance of apoptotic cells mediated by phagocytes, contributing to hyperactivity of B cells and the subsequent overproduction of autoantibodies [49]. This same CC genotype (rs763110) was already associated to lupus in three different ethnic populations, i.e. Iranians, Taiwanese and African Americans [3, 46, 49]. Of note, the C allele frequencies observed in the literature were different among the distinct ethnic groups, and this situation will be further discussed later. Back to *FASL* -844, as previously discussed, individuals carrying the *FASL* -844C allele could present more apoptosis of activated lymphocytes and macrophages among other cells, contributing to increased levels of nucleosomes in circulation and to the production of autoantibodies. This, in turn, could lead to immune complexes formation and to an overload of the body clearance system [46].

Although no statistical differences were observed for the allelic or genotype frequencies of the rs5030772 variant, haplotypic analyses comprising both these *FASL* polymorphisms were performed. In our study, a higher frequency of the C/A haplotype was observed in African-derived SLE patients. This observation corroborates previous data from a study with American SLE pedigrees that suggested that the activity of the *FASL* promoter depends on a *FASL* -844T/C/-478A/T haplotype more than on the alleles of each polymorphism individually [20], highlighting the importance of haplotypic studies.

Analyses of genetic polymorphisms involved in the intrinsic apoptosis pathway revealed that the genotypic frequencies of *BCL2* -938C>A polymorphism in European-derived patients were not in HWE. Although a statistically significant difference in the genotypic frequencies between SLE patients and controls was observed in this ethnic group, the fact that genotypes were not in HWE hinders further extrapolations. However, a

role for Bcl-2 in lupus pathogenesis can be suggested since it may allow an increased longevity of B cells, which, if related to pathogenic autoantibodies, will persist in the periphery. Also, T lymphocytes with high Bcl-2 expression maintain an activated state *in vivo* in SLE patients. This may lead to a hyperstimulation of the immune system in SLE, although a direct involvement of Bcl-2 in this pathology is still to be established [53, 54].

With respect to the influence of the *BAX* -248G/A polymorphism in SLE, our data revealed a possible contribution of this variant for the protection against the disease in the African-derived population. This is the first study suggesting an association between a SNP in the *BAX* gene and SLE. The *BAX* -248A variant is associated with reduced Bax protein expression and reduced apoptotic efficiency, as observed in osteomyelitis patients [55]. *BAX*-248G/A polymorphism have been also implicated in the risk of cancer, reduced protein expression and failure to achieve complete response to treatment [56, 57].

Despite the possible role in SLE susceptibility, the polymorphic variants studied were not associated with clinical progression of lupus in our patients. Also, the variants studied could be in linkage disequilibrium with other susceptibility genes, which can influence SLE susceptibility. This situation is exemplified by the distinct results seen in our patients classified according to the ethnic origin. Although it was possible to observe some gene associations with the group of patients classified as African-derived, the same was not true for the European-derived individuals, suggesting an interference of the patients genetic background. Thus, although it seems clear that polymorphisms in genes related to apoptosis are relevant to SLE susceptibility, the ethnic origin of patients should also be taken into consideration.

In conclusion, our data support a role for apoptosis related gene polymorphisms in SLE susceptibility. African-derived patients had higher frequencies of *FASL* genotypes,

alleles and haplotypes related to increased apoptosis. However, the patients presented lower frequency of the *BAX -248A* allele, related to lower protein expression which could represent a protective factor against to the disease.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the technical support of colleagues from Immunogenetics Laboratory of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, specially Jacqueline Maria Valverde Villegas, Francis Maria Bão Zambra and Thais Lopes. We thank the clinical support given by the medical professionals from Division of Rheumatology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that there is no conflict of interest.

FUNDING

This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Nadine Glesse received a CNPq Grant nº 161527/2011-6.

REFERENCES

1. Crispin, J.C., et al., *Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances*. Trends Mol Med, 2010. **16**(2): p. 47-57.
2. D'Cruz, D.P., M.A. Khamashta, and G.R. Hughes, *Systemic lupus erythematosus*. Lancet, 2007. **369**(9561): p. 587-96.
3. Moudi, B., et al., *Association of FAS and FAS ligand genes polymorphism and risk of systemic lupus erythematosus*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 176741.
4. Rekvig, O.P. and J. Van der Vlag, *The pathogenesis and diagnosis of systemic lupus erythematosus: still not resolved*. Semin Immunopathol, 2014. **36**(3): p. 301-11.
5. Chan, K.L. and C.C. Mok, *Development of systemic lupus erythematosus in a male-to-female transsexual: the role of sex hormones revisited*. Lupus, 2013. **22**(13): p. 1399-402.
6. Danchenko, N., J.A. Satia, and M.S. Anthony, *Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden*. Lupus, 2006. **15**(5): p. 308-18.
7. Molokhia, M. and P. McKeigue, *Systemic lupus erythematosus: genes versus environment in high risk populations*. Lupus, 2006. **15**(11): p. 827-32.
8. Xue, C., et al., *Abnormal Fas/FasL and caspase-3-mediated apoptotic signaling pathways of T lymphocyte subset in patients with systemic lupus erythematosus*. Cell Immunol, 2006. **239**(2): p. 121-8.
9. Kaplan, M.J., *Apoptosis in systemic lupus erythematosus*. Clin Immunol, 2004. **112**(3): p. 210-8.

10. Pieterse, E. and J. van der Vlag, *Breaking Immunological Tolerance in Systemic Lupus Erythematosus*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 164.
11. Navratil, J.S. and J.M. Ahearn, *Apoptosis, clearance mechanisms, and the development of systemic lupus erythematosus*. *Curr Rheumatol Rep*, 2001. **3**(3): p. 191-8.
12. Rastin, M., et al., *T lymphocyte apoptosis in systemic lupus erythematosus patients*. *Iran J Basic Med Sci*, 2013. **16**(8): p. 936-41.
13. Achour, A., et al., *Systemic lupus erythematosus in the elderly*. *Rheumatol Int*, 2010.
14. Kyttaris, V.C., S. Krishnan, and G.C. Tsokos, *Systems biology in systemic lupus erythematosus: integrating genes, biology and immune function*. *Autoimmunity*, 2006. **39**(8): p. 705-9.
15. Monticielo, O.A., et al., *The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus*. *Clin Rheumatol*, 2008. **27**(4): p. 413-9.
16. Zhuo, W., et al., *Polymorphisms of TP53 codon 72 with breast carcinoma risk: evidence from 12226 cases and 10782 controls*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009. **28**: p. 115.
17. Chen, K., et al., *Single-nucleotide polymorphisms at the TP53-binding or responsive promoter regions of BAX and BCL2 genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(9): p. 2008-12.
18. Nagy, G., A. Koncz, and A. Perl, *T- and B-cell abnormalities in systemic lupus erythematosus*. *Crit Rev Immunol*, 2005. **25**(2): p. 123-40.
19. Feng, Y., *[Studies on Fas ligand expression in patients with systemic lupus erythematosus]*. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 1997. **72**(4): p. 443-55.

20. Nolsoe, R.L., et al., *Functional promoter haplotypes of the human FAS gene are associated with the phenotype of SLE characterized by thrombocytopenia*. *Genes Immun*, 2005. **6**(8): p. 699-706.
21. Nagata, S. and T. Suda, *Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations*. *Immunol Today*, 1995. **16**(1): p. 39-43.
22. Lee, Y.H., et al., *Fas promoter -670 polymorphism is associated with development of anti-RNP antibodies in systemic lupus erythematosus*. *J Rheumatol*, 2001. **28**(9): p. 2008-11.
23. Mohammadzadeh, A., et al., *Evaluation of apoptosis-related gene Fas (CD95) and FasL (CD178) polymorphisms in Iranian rheumatoid arthritis patients*. *Rheumatol Int*, 2011.
24. Hiraide, A., et al., *Fas polymorphisms influence susceptibility to autoimmune hepatitis*. *Am J Gastroenterol*, 2005. **100**(6): p. 1322-9.
25. Borner, C., *The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions*. *Mol Immunol*, 2003. **39**(11): p. 615-47.
26. Brown, R., *The bcl-2 family of proteins*. *Br Med Bull*, 1997. **53**(3): p. 466-77.
27. Liphaus, B.L. and M.H. Kiss, *The role of apoptosis proteins and complement components in the etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus*. *Clinics (Sao Paulo)*, 2010. **65**(3): p. 327-33.
28. Strasser, A., et al., *Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(19): p. 8661-5.

29. Kohler, K.F. and M.L. Petzl-Erler, *No evidence for association of the TP53 12139 and the BAX-248 polymorphisms with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem)*. Int J Immunogenet, 2006. **33**(2): p. 141-4.
30. Li, C.P., et al., *Roles of Fas/Fasl, Bcl-2/Bax, and Caspase-8 in rat nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis*. Genet Mol Res, 2014. **13**(2): p. 3991-9.
31. Huang, Q.R., et al., *Evaluation of a new Apo-1/Fas promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients*. Rheumatology (Oxford), 1999. **38**(7): p. 645-51.
32. Huang, Q.R. and N. Manolios, *Investigation of the -1377 polymorphism on the Apo-1/Fas promoter in systemic lupus erythematosus patients using allele-specific amplification*. Pathology, 2000. **32**(2): p. 126-30.
33. Veit, T.D., et al., *Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2009. **18**(5): p. 424-30.
34. Vargas, A.E., et al., *Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations*. Braz J Med Biol Res, 2006. **39**(3): p. 321-5.
35. Hochberg, M.C., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(9): p. 1725.
36. Vitali, C., et al., *Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group*. Ann Rheum Dis, 2002. **61**(6): p. 554-8.
37. Miyakis, S., et al., *International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS)*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(2): p. 295-306.

38. Gladman, D., et al., *The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1996. **39**(3): p. 363-9.
39. Bombardier, C., et al., *Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE*. *Arthritis Rheum*, 1992. **35**(6): p. 630-40.
40. Lahiri, D.K. and J.I. Nurnberger, Jr., *A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies*. *Nucleic Acids Res*, 1991. **19**(19): p. 5444.
41. Sun, T., et al., *Polymorphisms of death pathway genes FAS and FASL in esophageal squamous-cell carcinoma*. *J Natl Cancer Inst*, 2004. **96**(13): p. 1030-6.
42. Zhang, Z., et al., *Polymorphisms of FAS and FAS ligand genes involved in the death pathway and risk and progression of squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(18): p. 5596-602.
43. Zhang, N., et al., *BCL-2 (-938C > A) polymorphism is associated with breast cancer susceptibility*. *BMC Med Genet*, 2011. **12**: p. 48.
44. Moshynska, O., K. Sankaran, and A. Saxena, *Molecular detection of the G(-248)A BAX promoter nucleotide change in B cell chronic lymphocytic leukaemia*. *Mol Pathol*, 2003. **56**(4): p. 205-9.
45. Long, J.C., R.C. Williams, and M. Urbanek, *An E-M algorithm and testing strategy for multiple-locus haplotypes*. *Am J Hum Genet*, 1995. **56**(3): p. 799-810.
46. Wu, J., et al., *A novel polymorphic CAAT/enhancer-binding protein beta element in the FasL gene promoter alters Fas ligand expression: a candidate background*

gene in African American systemic lupus erythematosus patients. J Immunol, 2003. 170(1): p. 132-8.

47. Xiang, N., et al., *Association of Fas gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. Mol Biol Rep, 2013. 40(1): p. 407-15.*

48. Pons-Estel, G.J., et al., *Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. Semin Arthritis Rheum, 2010. 39(4): p. 257-68.*

49. Chen, J.Y., et al., *The -844C/T polymorphism in the Fas ligand promoter associates with Taiwanese SLE. Genes Immun, 2005. 6(2): p. 123-8.*

50. Lu, M.M., et al., *Association of FAS gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus: A case-control study and meta-analysis. Exp Ther Med, 2012. 4(3): p. 497-502.*

51. Santos, N.P., et al., *Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. Hum Mutat, 2010. 31(2): p. 184-90.*

52. Wang, M., et al., *FAS and FAS ligand polymorphisms in the promoter regions and risk of gastric cancer in Southern China. Biochem Genet, 2009. 47(7-8): p. 559-68.*

53. Ohsako, S., et al., *Expression and function of Fas antigen and bcl-2 in human systemic lupus erythematosus lymphocytes. Clin Immunol Immunopathol, 1994. 73(1): p. 109-14.*

54. Johansson, C., et al., *Association analysis with microsatellite and SNP markers does not support the involvement of BCL-2 in systemic lupus erythematosus in Mexican and Swedish patients and their families. Genes Immun, 2000. 1(6): p. 380-5.*

55. Ocana, M.G., et al., *Bax gene G(-248)A promoter polymorphism is associated with increased lifespan of the neutrophils of patients with osteomyelitis*. Genet Med, 2007. **9**(4): p. 249-55.

56. Saxena, A., et al., *Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance*. Cancer Lett, 2002. **187**(1-2): p. 199-205.

57. Fegan, C., et al., *The role of the bax gene polymorphism G(-248)A in chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 2006. **20**(8): p. 1460-1.

Table 1. Demographic, clinical and laboratorial features of SLE patients.

Patient's features	Whole (427)	European-derived (318)	African-derived (109)	p-value ^a
Whole		74.5%	25.5%	
Females	91.8% (427)	90.9% (318)	94.5% (109)	0.235
Age (years)	47.84 ± 14.76 (427)	48.09 ± 15.12 (318)	47.11 ± 13.70 (109)	0.529
Age of symptoms (years)	30.52 ± 13.42 (422)	30.26 ± 13.55 (314)	31.28 ± 13.08 (108)	0.440
Age at diagnosis (years)	32.48 ± 13.62 (413)	32.04 ± 13.71 (307)	33.76 ± 13.35 (106)	0.253
Malar rash	56.9% (427)	58.8% (318)	51.4% (109)	0.215
Discoid rash	13.8% (427)	13.5% (318)	14.7% (109)	0.888
Photosensitivity	74.7% (427)	79.9% (318)	59.6% (109)	<0.001
Oral or nasal ulcers	35.6 % (427)	37.1% (318)	31.2% (109)	0.319
Arthritis	81.5% (427)	82.7% (318)	78.0% (109)	0.341
Serositis	29.4% (425)	28.2% (316)	33.0% (109)	0.402
Nephritis	44.3% (427)	45.0% (318)	42.2% (109)	0.696
Neurologic disorders	12.9% (427)	13.2% (318)	11.9% (109)	0.858
Hematologic disorders	76.6% (427)	72.6% (318)	88.1% (109)	0.002
Hemolytic anemia	24.1% (427)	24.2% (318)	23.9% (109)	1.000
Leukopenia/lymphopenia	62.3% (427)	57.9% (318)	75.2% (109)	0.002
Thrombocytopenia	18.7% (427)	18.2% (318)	20.2% (109)	0.770
Immunologic disorders	69.3% (424)	70.2% (315)	67.0% (109)	0.663
Anti-DNA	48.8% (424)	50.2% (315)	45.0% (109)	0.349
Anti-Sm	20.1% (422)	18.4% (315)	25.2% (107)	0.167
Anticardiolipin	27.6% (420)	28.4% (313)	25.2% (107)	0.607
Lupus anticoagulant	7.4% (420)	9.0% (312)	2.8% (108)	0.056
False-positive VDRL	5.2% (420)	5.8% (312)	3.7% (108)	0.562
ANA	99.5% (425)	99.7% (316)	99.1% (109)	0.448
Anti-Ro/SSA	43.2% (403)	37.6% (298)	59.0% (105)	<0.001
Anti-La/SSB	12.7% (403)	10.4% (298)	19.0% (105)	0.034
Anti-RNP	30.5% (403)	30.2% (298)	31.4% (105)	0.911
Anti-Scl 70	2.7% (403)	3.0% (298)	1.9% (105)	0.799
Sjögren	8.3% (410)	9.6% (303)	4.7% (107)	0.169
APS	5.9% (409)	6.6% (302)	3.7% (107)	0.395
SLEDAI	1 (0-36) (379)	1 (0-21) (276)	1 (0-36) (103)	0.918
SLICC	1 (0-7) (406)	1 (0-7) (300)	1 (0-5) (106)	0.761

ANA: antinuclear antibody; APS: secondary antiphospholipid syndrome; SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; SLICC: systemic lupus international collaborating clinics; VDRL: venereal disease research laboratory test. ^aChi-squared test for qualitative variables and Mann–Whitney test for quantitative variables.

Table 2. Demographic characteristics of SLE patients and healthy controls.

	Controls (543)	SLE Patients (427)	P value
Age (years)	39.02 ± 11.24 (515)	47.84 ± 14.76 (427)	<0.001^a
Ethnicity			
European-derived	52.67% (515)	74.47% (427)	
African-derived	47.33% (515)	25.53% (427)	
Sex			
Male	67.60% (463)	8.20% (427)	<0.001^b
Female	32.40 % (463)	91.8% (427)	

^a Student's t test.

^b Chi-square test with Yates.

Age: mean ± standard deviation

Table 3. Genotypic and allelic frequencies of *FASL -844 (T/C)* and *FASL IVS2nt-124 (A/G)* polymorphisms between SLE patients and controls, according to ethnic origin.

<i>FASL -844 T/C</i>	European-derived		African-derived	
	Patients n=317	Controls n=284	Patients n=109	Controls n=231
	n (freq.)	n (freq.)	n (freq.)	n (freq.)
TT ¹	60 (0.19)	55 (0.19)	33 (0.30) ^a	115 (0.50) ^a
CT ²	159 (0.50)	113 (0.40)	54 (0.50)	99 (0.43)
CC ³	98 (0.31)	116 (0.41)	22 (0.20) ^b	17 (0.07) ^b
	p=N/A ^c		p<0.001	
			^a adjusted residual, χ^2 p=0.00071	
			^b adjusted residual, χ^2 p=0.00053	
			^{1,2} OR 1.90 (CI 95% 1.11 – 3.28) p=0.038	
			^{1,3} OR 4.51 (CI 95% 2.01 – 10.13) p<0.001	
			^{2,3} OR 2.37 (CI 95% 1.09 – 5.18) p=0.051	
T	279 (0.44)	223 (0.39)	120 (0.55)	329 (0.71)
C	355 (0.56)	345 (0.61)	98 (0.45)	133 (0.29)
	p=0.108		p<0.001	
			OR 2.02 (CI 95% 1.42 – 2.86)	
<i>FASL IVS2nt-124 A/G</i>	n=306	n=278	n=108	n=189
AA	235 (0.77)	210 (0.76)	94 (0.87)	174 (0.92)
AG	65 (0.21)	65 (0.23)	14 (0.13)	15 (0.08)
GG	6 (0.02)	3 (0.01)	0 (0.00)	0 (0.00)
	p=0.619		p=0.230	
A	535 (0.87)	485 (0.87)	202 (0.94)	363 (0.96)
G	77 (0.13)	71 (0.13)	14 (0.06)	15 (0.04)
	p=0.993		p=0.242	

^cN/A: not applicable (genotypic frequencies were not in HWE).

Table 4. Haplotype estimated frequencies of *FASL* -844 (T>C) and *FASL* IVS2nt-124 (A>G) polymorphisms in SLE patients and controls, according to ethnic origin.

<i>FASL</i> -844/ <i>FASL</i> IVS2nt-124	European-derived		African-derived	
	Patients	Controls	Patients	Controls
	2n=612	2n=556	2n=216	2n=368
T/A ¹	196 (0.32)	147 (0.26)	105 (0.49) ^a	252 (0.68) ^a
T/G ²	74 (0.12)	70 (0.12)	14 (0.06)	15 (0.04)
C/A ³	339 (0.55)	338 (0.61)	97 (0.45) ^b	101 (0.27) ^b
C/G ⁴	3 (0.01)	1 (0.002)	0	0
	p = 0.136		p<0.001	
			^{1,2} OR 0.45 (CI 95% 0.19 – 1.04) p=0.123	
			^{1,3} OR 2.30 (CI 95% 1.58 – 3.36) p<0.001	
			^{2,3} OR 1.03 (CI 95% 0.44 – 2.44) p=1.000	

^aAdjusted residual: p=2.0E-6

^bAdjusted residual: p=1.7E-5

Tabela 5. Genotypic and allelic frequencies of *BCL-2* -938 (C>A) and *BAX* -248(G>A) polymorphisms between SLE patients and controls, according to ethnic origin.

<i>BCL-2</i> -938 C/A	European-derived		African-derived	
	Patients n=246 n (freq.)	Controls n=260 n (freq.)	Patients n=83 n (freq.)	Controls n=80 n (freq.)
CC	61 (0.26)	46 (0.18)	21 (0.25)	32 (0.40)
CA	106 (0.43)	142 (0.55)	49 (0.59)	41 (0.51)
AA	79 (0.32)	72 (0.28)	13 (0.16)	7 (0.09)
	p=N/A ^c		p=0.093	
C	228 (0.46)	234 (0.45)	91 (0.55)	105 (0.66)
A	264 (0.54)	286 (0.55)	75 (0.45)	55 (0.34)
	p=0.715		p=0.060	
<i>BAX</i> -248 G/A	n=297	n=212	n=101	n=13
GG ¹	224 (0.75)	153 (0.72)	80 (0.79) ^a	4 (0.31) ^a
GA ²	67 (0.23)	55 (0.26)	19 (0.19) ^b	8 (0.62) ^b
AA ³	6 (0.02)	4 (0.02)	2 (0.02)	1 (0.07)
	p=0.677		<p>p=0.0012</p> <p>^a adjusted residual, χ^2 p=0.00019</p> <p>^b adjusted residual, χ^2 p=0.00065</p> <p>^{1,2} OR 0.12 (IC 95% 0.02– 0.51) p=0.003</p> <p>^{1,3} OR 0.10 (IC 95% 0.00– 7.36) p=0.391</p> <p>^{2,3} OR 0.84 (IC 95% 0.04– 55.82) p=1.000</p>	
G	515 (0.87)	361 (0.85)	179 (0.89)	16 (0.62)
A	79 (0.13)	63 (0.15)	23 (0.11)	10 (0.38)
	p=0.538		<p>p<0.001</p> <p>OR 0.21 (IC 95% 0.08– 0.58)</p>	

^cN/A: not applicable (genotypic frequencies were not in HWE).

Table 6. *FAS*, *FASL*, *BCL-2* and *BAX* polymorphisms and their influence on the clinical and laboratory characteristics of SLE patients, according to ethnic origin.

	African-derived SLE patients		P value ^a		European-derived SLE patients		P value ^a
	APS				thrombocytopenia		
<i>FAS -1377G/A</i>	Yes	No		<i>FASL -844T/C</i>	Yes	No	
<i>AG</i>	75%	16.5%	0.003	<i>CC</i>	43.1%	28.2%	0.026
<i>GG</i>	25%	81.6%	0.006	<i>CT</i>	36.2%	53.3%	0.019
	serositis				APS		
	Yes	No			Yes	No	
<i>AG</i>	5.6%	24.7%	0.015	<i>TT</i>	0%	20.6%	0.024
<i>GG</i>	94.4%	72.6%	0.008				
	thrombocytopenia				leukopenia/lymphopenia		
<i>AA</i>	Yes	No		<i>FASL IVS2nt-124A/G</i>	Yes	No	
	9.1%	0%	0.005	<i>GG</i>	3.4%	0%	0.037
				<i>AG</i>	26.3%	14.2%	0.011
				<i>AA</i>	70.4%	85.8%	0.002
	anti-DNA antibodies						
<i>FASL -844T/C</i>	Yes	No					
<i>CC</i>	30.6%	11.7%	0.014				
<i>TT</i>	18.4%	40%	0.014				
	Immunologic disorders						
	Yes	No					
<i>CC</i>	26%	8.3%	0.030				
	anti-DNA antibodies						
<i>BCL-2 -938C/A</i>	Yes	No					
<i>AA</i>	25.7%	8.3%	0.031				
<i>CC</i>	14.3%	33.3%	0.049				

^aAfter Bonferroni's correction, all of the significant p values were lost. APS: secondary antiphospholipid syndrome

CAPÍTULO 5 - ARTIGO 2

The influence of abnormal apoptosis of T cells subpopulations in the pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus

Nadine Glesse¹, Catarina Addobbati Jordão Cavalcanti³, Renata Livi Ramos², Odirlei André Monticielo², João Carlos Tavares Brenol², Ricardo Machado Xavier², José Artur Bogo Chies¹, Priscila Vianna¹.

¹Laboratory of Immunogenetics, Institute of Biosciences, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ²Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ³Laboratory of Immunopathology, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

Manuscrito em fase final de preparação a ser enviado à revista *Lupus*.

THE INFLUENCE OF ABNORMAL APOPTOSIS OF T CELLS SUBPOPULATIONS IN THE PATHOGENESIS OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS

Nadine Glesse¹, Catarina Addobbati Jordão Cavalcanti³, Renata Livi Ramos², Odirlei André Monticielo², João Carlos Tavares Brenol², Ricardo Machado Xavier², José Artur Bogo Chies¹, Priscila Vianna¹.

¹Laboratory of Immunogenetics, Institute of Biosciences, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ²Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ³Laboratory of Immunopathology, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

Corresponding author:

Dra. Priscila Vianna. Email Address: privianna@gmail.com

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Laboratory of Immunogenetics. Institute of Biosciences, Department of Genetics.

Bento Gonçalves Avenue – 9500, Campus do Vale. 91501970

Porto Alegre, RS – BRAZIL. PO BOX 15053

Phone: +55 51 3308 6740; Fax: +55 51 3308 7311

ABSTRACT

Apoptosis is a vital process for multicellular organisms and plays a critical role in autoimmunity. Disturbances in apoptosis could increase the exposure of autoantigens and the production of autoantibodies. Regulatory T cells (Treg) mediate the immunological mechanisms of self-tolerance and prevention of autoimmunity. Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) showed T cells with altered expression of apoptotic genes and proteins. In an attempt to understand the disturbances in SLE and to elucidate the influence of apoptosis specially on Treg cells, 50 SLE women subjects and 50 healthy women blood donors were evaluated. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) immunophenotyping was performed in order to analyze Fas, FasL, Bcl-2, Bax and p53 protein expression by flow cytometry. Analysis at genetic level was performed by specific TaqMan Gene Expression Assays. SLE patients showed an increased frequency of Treg cells ($p=0.001$, vs. controls) and a greater density of FoxP3 expression ($p=0.003$ vs. controls). In addition, SLE subjects showed increased frequency of $CD4^+$ T cells expressing Fas and p53 ($p=0.002$ and $p=0.025$ vs. controls, respectively) and $CD8^+$ T cells expressing Bax and p53 ($p=0.001$ and $p<0.001$ vs. controls, respectively). The lower frequency of $CD4^+$ T cells expressing Bcl-2 ($p<0.001$ vs. controls) was supported by the relation found between the decreased percentage of $CD4^+$ T expressing Bcl-2 and the disease severity ($p=0.031$) and also by the downregulated *BCL-2* gene in SLE patients ($p=0.02$ vs. controls). $CD8^+$ T cells expressing p53 were associated with anti-DNA antibodies ($p=0.02$). A higher frequency of cell death in peripheral lymphocytes from SLE patients was also observed ($p=0.001$ vs. controls). In conclusion, our data point out to an apoptotic pathway deregulation in SLE pathogenesis, mediated in part by altered apoptosis protein expression on T cell subpopulations.

Keywords: systemic lupus erythematosus, apoptosis, regulatory T cells.

INTRODUCTION

The immunological regulatory mechanisms that maintain self-tolerance and prevent autoimmune conditions are in part mediated by regulatory T cells (Treg cells), which correspond to 5-10% of peripheral blood CD4⁺ T cells in healthy humans and mice (1). Treg cells suppress autoreactive lymphocytes, inhibiting the activation and expansion of CD4⁺ T helper cells, the differentiation of cytotoxic CD8⁺ T cells as well as inhibiting B cell activation (2). Their suppressive capacity is mediated by the secretion of suppressive cytokines, such as TGF- β and IL-10, cell-to-cell contact or even through the active transfer of small metabolites (3). The hallmark of Treg cells is the expression of the forkhead transcription factor FoxP3 (4) concomitantly with low CD127 and high CD25 membrane expression (5, 6). CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-} T cells are a naturally occurring Treg in human peripheral blood (7). The loss of self-tolerance could induce autoimmune conditions that cause damage to the organism triggering inflammatory and deleterious responses that, in turn, promote tissue injury. Systemic lupus erythematosus (SLE) is an inflammatory chronic autoimmune disease in which environmental factors, in a genetically susceptible individual, induce the activation of both innate and adaptive immune responses, resulting in loss of immunological tolerance and autoantibody production (8, 9). Treg cells are important in SLE pathogenesis since abnormalities in this subpopulation may contribute to T and B cell hyperactivity. However, the exact function of Treg cells in this disorder is still a focus of debate, since different studies have reported decreased, normal or even increased numbers of Treg cells with distinct suppressive capacity in SLE patients (10-14). This heterogeneity may be partially explained by the criteria used to characterize the Treg subpopulation. Furthermore, the degree of disease activity and the use of distinct

immunosuppressive therapies by the patients as well as different methodological approaches could contribute to the divergence of findings (15).

SLE is also characterized by an imbalanced pro- and anti-inflammatory cytokine profile, by the occurrence of hyperactive immune cells, lymphocyte subset abnormalities, systemic inflammation and organ damage. In SLE pathogenesis, immune complexes of antinuclear antibodies (ANAs) and nuclear antigens accumulate in the tissues and stimulate cytokine production, systemically intensifying inflammation (16). Although the SLE etiology has not yet been fully unveiled several mechanisms have been proposed to explain disease development. Among them, defective apoptosis and impaired clearance of apoptotic cells seems to be good candidates (17-19). Considering the importance of apoptosis in autoimmune development, the understanding of how the programmed cell death process participates in the pathogenesis of SLE is critical. Apoptosis is a regulated process important to normal biologic functions in all multicellular organisms. It is essential for cell elimination, lymphocyte repertoires development and immune response regulation (18, 20). Apoptosis is characterized by membrane blebbing, cleavage of DNA and degradation of cellular components. It is well established that the extracellular release of nuclear antigens from cell death may induce immune complexes formation, which are considered pathogenic and an important hallmark in SLE development (16). Apoptosis potentially plays a relevant role in SLE pathogenesis in different ways: (1) a defective apoptosis may lead to impaired elimination of autoreactive T and/or B lymphocytes, leading to the loss of self-tolerance; (2) the presentation of self-antigens and/or the exposure of modified proteins may trigger immune responses and induce B cells that produce autoantibodies; (3) the induction of apoptosis may be an effector mechanism directly causing cell damage in SLE individuals (20-23). Investigations support that SLE

patients show increased apoptosis of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), especially of T lymphocytes (24), and a decreased resistance of activated T cells to apoptosis (25).

Both the extrinsic and intrinsic apoptosis signaling pathways were already approached in autoimmunity. For instance, it has been suggested that abnormal apoptosis may be a consequence of alterations in genes and proteins related to programmed cell death, such as Fas and Bcl-2 (23). Recent reports pointed out an elevated expression of Fas and FasL on T cell surface that contribute to increased apoptosis rate in patients with lupus, playing important role in dysfunction of immune regulation (22, 26-28). Moreover, the impaired cell death mediated by Bcl-2 affects the development of Treg cells and limits their function in mice (29). Considering that immunosuppression regulated by Treg cells and the death of immune effector cells are both essential for the maintenance of immunological tolerance, any failure in these processes could result in an exacerbated immune response and consequently in autoimmune disease development. Despite the well-established role of proteins regulating extrinsic and intrinsic apoptosis pathways in the immune system homeostasis and observations of their frequent deregulation in autoimmune disorders, it is still poorly understood how these proteins affect the development and function of T helper and Treg cells in SLE. In this context, we investigated the key molecular and cellular mechanisms involved in SLE development, by analyzing the expression of Fas, FasL, Bax, Bcl-2 and p53 genes and proteins.

MATERIALS AND METHODS

Study population

This is a prospective controlled cross-sectional study that included 50 women who fulfilled the American College of Rheumatology (ACR) criteria for SLE diagnosis (30) and 50 healthy women blood donors. The SLE patients were recruited at the Division of Rheumatology from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil. Data about demographic, clinical and laboratory characteristics of SLE patients were collected from medical records filled in the Medical Archive Service and Health Information (Table 1). The mean age of patients was 42.18 ± 10.51 years and the mean age of first symptoms and diagnosis were 28.66 ± 11.23 and 31.24 ± 11.69 years, respectively. SLE patients were evaluated according to presence or absence of malar rash, discoid rash, photosensitivity, oral or nasal ulcers, arthritis, serositis, pleurisy, pericarditis, nephritis, neurological manifestations, hematologic events (hemolytic anemia, leucopenia/lymphopenia and thrombocytopenia), positive antinuclear antibody (ANA) (titer $>1:100$) and other auto-antibodies (anti-double-stranded DNA, anti-Sm, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anti-RNP, anti-Scl70, anticardiolipin, lupus anticoagulant and false positive VDRL), and established therapy (glucocorticoids, cyclophosphamide, methotrexate, azathioprine, chloroquine/hydroxychloroquine, mycophenolate mofetil, cyclosporine and rituximab). The patients were also evaluated for the presence of Sjögren's Syndrome and Secondary Antiphospholipid Syndrome (APS), according to the criteria of classification defined for both diseases (31, 32). SLICC (systemic lupus international collaborating clinics) damage index (33) and the disease activity assessment using SLEDAI (systemic lupus erythematosus disease activity index: SLEDAI=6-10: moderate SLE; SLEDAI=1-5 mild SLE; SLEDAI=0: inactive SLE) (34) were also performed for all patients. The control group consisted of 50 healthy women blood donors with a mean age of 34.90 ± 12.53 , without autoimmune disease history, recruited at the Haemotherapy Service from HCPA.

At the time of recruitment, written informed consent was obtained from all participants. This study was approved by the Ethics Committee of UFRGS (96.672) and HCPA (23200).

Blood collection and cell preparation

Peripheral blood (10 mL) was collected in EDTA tube by venipuncture and the plasma samples were immediately stored at -80°C. PBMCs were isolated by density gradient using Ficoll-hypaque (Pharmacia). After centrifugation, the PBMCs were collected and washed two times in 1X PBS. The cell pellet was suspended in 1mL of RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) supplemented with 10% of FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich), 2% glutamine and 100 U/ml penicillin-0.1 mg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich). Cells were counted by means of microscopy in a Neubauer Chamber and the viability always exceeded 95%, as judged from their ability to exclude Trypan Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Then, PBMCs were added on 96 well plates "U bottom" at a concentration of the 200.000 cells/well for subsequent staining with antibodies.

Immunophenotyping

The isolated PBMCs were incubated with specific antibodies in order to analyze the expression of Fas, FasL, Bcl-2, Bax and P53 on different T cells subsets. The following labelled monoclonal antibodies were used, according to the manufacturer's instructions: isotype controls, CD3-FITC or CY.5, CD4-CY.5, CD8-PE or CY.5, CD25-FITC, PE or APC-H7, FoxP3-PE or ALEXA 647, CD95(Fas)-FITC, Bcl-2-FITC, P53-ALEXA-FLUOR 488, CD127-PE, CD56-FITC, CD16-PE, all purchased from BD Biosciences, San Diego, CA. We also used the antibodies anti-Bax-ALEXA FLUOR 488 (Santa Cruz

Biotechnology, Dallas, Texas) and anti-CD178(FasL)-PE (eBioscience, San Diego, CA). Non-stained controls were included in all experiments. After surface markers staining for 20 minutes in dark and room temperature, cells were washed twice and resuspended in staining buffer (bovine serum albumin 0.1%, sodium azide 0.02% and PBS 1X). The intracellular staining for FoxP3, Bcl-2, Bax and p53 was performed after cell permeabilization using the BD Pharmingen™ Transcription Factor Buffer Set according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, San Diego, CA) and kept at 4°C for 40 minutes protected from light. The cells were washed and suspended in staining buffer. The frequency of cells expressing the surface and intracellular markers was measured by flow cytometry (BDFACSAria™ III cell-sorter flow cytometer - BD Biosciences, San Diego, CA). We also evaluated the frequencies of early apoptosis and cell death using the Annexin V-FITC and 7-AAD cell viability dye, respectively, both from BD Biosciences, San Diego, CA. Furthermore, the mean fluorescence intensity (MFI) of Treg cells ($CD4^+CD127^{low}CD25^{high}Foxp3^+$) was estimated. The frequency of positive cells was calculated from lymphocyte gates and 30.000 events were gated by size (FSC) and granularity (SSC). Compensation was made with non-stained and single stained controls. The raw data of FACS analysis was processed using the software FlowJo 7.5.5 (Tree Star Corporation, Ashland, OR).

Whole blood RNA extraction and cDNA synthesis

An aliquot of peripheral blood sample were collected from a group of 20 SLE patients and 29 healthy controls and immediately used for RNA isolation, which was performed using the QIAamp RNA Blood Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. For cDNA synthesis, we followed the ImProm-

II™ Reverse Transcription System for RT-PCR kit (Promega,USA) standard protocol, employing for each sample a standard RNA input of 500ng. Oligo(dT) was used as primers in all samples.

Gene expression analysis

FAS, *FASL*, *BCL-2*, *BAX* and *TP53* cDNA were amplified with specific TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, USA) using the ABI 7500 SDS platform (Applied Biosystems, USA). *GAPDH* was the housekeeping gene used for normalization. Relative quantitative expression was calculated as Fold Change (FC) following the indications (35).

Statistical analysis

All variables were tested for normality of distribution by means with the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical analysis of data was performed using Student's t or Mann-Whitney tests and ANOVA one way or Kruskal-Wallis tests. Comparisons between frequencies of cells expressing different apoptosis markers and the activity index (SLEDAI) was performed using ANOVA one way or Kruskal-Wallis tests and Student's test when appropriate. Student's t-test was also used as post test to compare the gene expression levels between the studied groups. The significance level was set at $\alpha=0.05$ (two-tailed). Analysis of data were performed through the SPSS 15.0 Software (Inc, Chicago, IL).

RESULTS

Demographic, clinical and laboratory characteristics of SLE patients were summarized in Table 1. The most frequent clinical characteristics presented by the sample of 50 female SLE patients were hematologic (82%) and immunologic disorders (78.3%), with 100% of patients having positivity for ANA, followed by photosensitivity (74%). Concerning the activity of the disease (SLEDAI), 50% of patients were classified with active SLE (mild and moderate) and 50% with inactive SLE. Furthermore, 60% use immunosuppressive therapy and 84% use antimalarial therapy.

Frequency of CD4⁺CD127^{low}CD25^{high} cells expressing Foxp3 in PBMCs from SLE patients

The subset of natural Treg cells shows a potent immunosuppressive capacity and contributes to immunological self-tolerance, which is lost in SLE context (36). We evaluated the frequency of CD4⁺CD127^{low}CD25^{high} cells in SLE women patients and controls (Table 2). Data showed a higher frequency of peripheral blood Treg cells in SLE women when compared to healthy controls (11.70 ± 1.00 vs. 7.78 ± 0.49 , $p=0.001$; Figure1a). The CD4⁺CD127^{low}CD25^{high} cells from SLE patients also showed a greater density of FoxP3 expression (as estimated by MFI), in relation to controls (270.21 ± 139.74 vs. 7.03 ± 1.35 , $p=0.003$; Figure1b and c). Moreover, interestingly our data showed that the frequency of CD4⁺CD127^{low}CD25^{high} subpopulation appears to increase with the severity of the disease, although no statistical difference in the frequencies of cells was found among the groups according to SLEDAI (Table 3).

We also investigated whether the number of Treg cells differed in SLE patients using immunosuppressive therapy in relation to those who do not use. The results showed

a slight increase, but not significant, on proportion of CD4⁺CD127^{low}CD25^{high} cells in patients using immunosuppressive therapy (13.02 ± 1.34 vs. 9.73 ± 1.41).

Fas and FasL proteins expression on different subsets of T cells

We have also addressed the influence of Fas (CD95) and FasL (CD178) proteins expression on the surface of CD4⁺ T, CD8⁺ T and Treg cells in SLE (Table 2). Women with SLE presented a higher frequency of CD4⁺ T cells expressing CD95 when compared to controls (51.64 ± 2.97 vs. 39.46 ± 2.30 , $p=0.002$). No differences were observed in the frequencies of CD8⁺ T cells and Treg cells populations expressing CD95 between the groups (Figure 2a and b). The percentage of CD3⁺ T, CD4⁺ T, CD8⁺ T and Treg cells positive for CD178 were similar between SLE patients and controls.

Bcl2 family proteins expression

The frequency of CD4⁺ T cells expressing the antiapoptotic Bcl-2 intracellular protein was significantly decreased in SLE women as compared to controls (87.96 ± 1.62 vs. 94.50 ± 0.68 , $p<0.001$). No difference was found in the frequency of CD8⁺ T and Treg cells expressing Bcl-2 between groups (Table 2, Figure 3a). Otherwise, with respect to Bax, a proapoptotic protein belonging to the same Bcl-2 family, women with SLE presented an increased number of CD8⁺ T cells expressing Bax than controls (63.88 ± 5.16 vs. 24.71 ± 8.76 , $p=0.001$, Figure 3b).

P53 protein expression

Evaluating lymphocytes from SLE patients and controls concerning the expression of p53 protein, we have identified a significantly higher frequency of both CD4⁺ T and

CD8⁺ T cells expressing p53 in SLE patients when compared to controls (13.35 ± 1.74 vs. 11.62 ± 2.34 , $p=0.025$ and 25.35 ± 3.95 vs. 0.5 ± 0.33 , $p<0.001$ respectively; Figure 4a). Interestingly, it was possible to observe an increased number of CD8⁺ T cells expressing p53 in SLE patients with positivity for anti-DNA antibodies in relation to those without anti-DNA antibodies (31.06 ± 4.97 vs. 16.17 ± 2.50 , $p=0.02$; Figure 4b). We found no statistically significant difference in the frequencies of T reg cells expressing p53 between the studied groups (Table2, Figure 4a).

Apoptosis of T cells in SLE patients and controls

We measured the rate of apoptosis in lymphocytes from SLE patients and controls using AnnexinV binding as an indicator of phosphatidyl serine surface exposure in early apoptotic cells and 7-AAD DNA staining as cell death indicator. Through the dot plots, we differentiated viable cells (Annexin V⁻ 7-AAD⁻) from early apoptotic cells (Annexin V⁺7-AAD⁻) and cell death (Annexin V⁺7-AAD⁺). Our data showed that SLE patients presented a higher percentage death of lymphocytes (CD3⁺Annexin V⁺ 7-AAD⁺) as compared to control group (1.66 ± 0.36 vs. 0.65 ± 0.08 , $p=0.001$) (Table 2, Figure 5a and b). No difference was found in relation to the rate of early apoptotic cells (CD3⁺Annexin V⁺7-AAD⁻) between the groups.

Apoptotic proteins expression and the SLEDAI

Considering the disease activity index (SLEDAI), from 50 patients sampled with SLE, 5 patients presented moderate SLE (SLEDAI = 6-10), 20 patients had mild SLE (SLEDAI = 1-5) and 25 showed inactive SLE (SLEDAI = 0). In order to address whether the disease activity influences the frequency of T cells, we evaluated the proportion of T

cells expressing the apoptotic markers in the three groups according to the SLEDAI. Our analysis showed that SLE patients with inactive disease had a higher frequency of CD4⁺ T cells expressing Bcl-2 when compared to patients with active disease (moderate) (91.05 ± 1.87 vs. 76.80 ± 10.09 ; $p=0.031$; Table 3, Figure 3c).

FAS, FASL, BCL-2, BAX and TP53 expression by real-time quantitative PCR

Analysis of mRNA levels of apoptotic genes were performed in 20 SLE patients and 29 controls. Our data revealed that SLE patients showed a lower expression of antiapoptotic *BCL-2* gene when compared to controls (-1.43-fold, $p=0.02$, Figure 6). No significant difference was found in relation to the mRNA levels of other genes studied.

DISCUSSION

In the preset study, we proposed a comprehensive and global analysis of apoptosis in SLE, through the investigation of some apoptotic markers, at genetic and protein levels, on different subpopulations of T cells, especially on Treg cells. Initially, the frequency of Tregs was evaluated in PBMCs from SLE patients and compared with healthy controls. A major barrier on the study of Treg cells concerns the very definition of this subset through specific cell surface biomarkers in order to distinguish Treg from other regulatory or effector T cells. It was established that Treg cells with suppressive capacity express lower levels of IL-7R (CD127) than other CD4⁺ T cells and that CD127 expression is inversely correlated with Foxp3 on these cells (37). Thus, we choose to define our regulatory T cells as CD4⁺CD127^{low}CD25^{high}Foxp3⁺.

Our data showed that the number of CD4⁺CD127^{low}CD25^{high} cells was increased in the peripheral blood of SLE patients and that these cells showed a higher density of FoxP3

expression in comparison to healthy controls ($p=0.001$ and $p=0.003$, respectively). The frequency of Treg cells in SLE has been measured by multiple groups (38-40). Unlike our findings, most of them have observed decreased Treg cell percentages in SLE patients. Moreover, this decreased proportion of Treg cells was inversely correlated with disease activity in several studies (41, 42). Our data showed a possible but weak positive relation between the frequency of Treg cells and SLEDAI index, since, although not statistically significant, the Treg cells frequency increased with the SLE severity. Venigalla *et al.* reported an increase in Treg cell frequency in active SLE patients. However, the fluorescence intensity mean of FoxP3 in $CD4^+CD25^{\text{high}}$ T cells did not differ between patients with active SLE and donors (38). Some data have pointed out that defects in suppression mediated by Treg cells are related with disease activity (38, 43). One of the main question that motivated our study was the fact that defects in the Treg suppressive capacity have been attributed to an increased sensitivity of these cells to apoptosis mediated by the death receptor Fas (44).

When we investigated the possible influence of immunosuppressive therapy in the number of Treg cells, we observed a slight, but not significant, increase of Treg cells in those patients who use immunosuppressive drugs compared to those not using such therapy. Elevated frequencies of Treg cells in SLE patients following treatment with corticosteroids were already reported by other groups (45-47). We suggested that as most patients in our study are using some therapy to control the disease, this may be inducing the expansion or generation of Treg cells. It had been already discussed that a high number of Treg cells may be due to over-expression and modulation of glucocorticoid-induced TNF-receptor or due to an increase in the expression of cytokines receptors and consequently high expression of CD25. Other studies showed that corticosteroids suppress

the expression of proinflammatory cytokines while induce TGF- β expression and that steroids may induce apoptosis in CD4⁺CD25⁺ T cells indirectly increasing the frequency of Treg (45, 48).

Apoptosis plays an important role in SLE pathogenesis (20). Several groups have demonstrated the altered expression of molecules involved in apoptotic regulation on different subpopulations of T cells (22, 28, 49). Since there are two main pathways involved in apoptosis, the extrinsic pathway activated by ligation of Fas/FasL, and the intrinsic pathway, mediated by the mitochondria (29), we studied relevant apoptosis proteins on T cells subsets which are involved in both pathways: Fas, FasL, Bcl-2, Bax and p53. In normal immune circumstances, the activity against self-antigens is prevented by mechanisms related to the Fas pathway of apoptosis, which is involved in the process of immune tolerance by the deletion of autoreactive T and B cells (28). In the present work, a higher frequency of CD4⁺ T cells expressing Fas was observed in SLE women when compared to controls (p=0.002). In contrast, no differences were seen in the frequencies of positive cells for its ligand FasL on the different T cell subsets evaluated between SLE patients and controls. Our findings are in accordance with other studies that showed a higher expression of Fas on PBMCs from SLE patients (27, 28, 49, 50). Considering that increased Fas expression results in a higher susceptibility to Fas-mediated apoptosis, it may contribute to increase apoptosis levels in lymphocytes in SLE patients (28). It is already known that interactions between Fas and FasL have a profound impact on self-tolerance and autoimmune development. Failure to express either Fas or FasL leads to the production of autoantibodies in mouse strains and is associated with accelerated clinical disease in almost all SLE-prone murine lines (51).

Proteins of the Bcl-2 family are critically involved in selection and maturation processes of T cells in the thymus. Its role in the immune system and their frequent deregulation in autoimmune pathologies have been already proposed (29). When we evaluated T cells subsets according to the expression of the intracellular proteins Bcl-2 and Bax, we observed a downregulation of antiapoptotic Bcl-2 in CD4⁺ T cells and an upregulation of proapoptotic Bax in CD8⁺ T cells in SLE women (p<0.001 and p=0.001, respectively). Both data pointed to a possible increase of T cells suffering apoptosis in these patients. Although it is already known that changes in the intrinsic pathway contribute to autoimmunity and that the overexpression of Bcl-2 in mice impairs the negative selection of thymocytes and developing of B cells, little or fragmented information is available about how the regulation mediated by Bcl-2 and Bax impacts the T cell apoptosis susceptibility (29). In contrast to previous studies, our work did not show an increased frequency of T cells expressing Bcl-2 in SLE patients (50, 52-55). Remarkably, there is data suggesting that immunosuppression therapy contributes, directly or indirectly, to the reduction of Bcl-2, since immunosuppression modify the disease by modulating and restoring the apoptotic deregulation (52), which could partly explain our findings. According to Graninger *et al.*, SLE patients and controls did not differ with respect to intracellular Bax intensity, differently than we found. Further, these authors observed that the addition of interleukin-2 (IL-2) in lymphocytes in culture enhanced the Bcl-2 expression already elevated in SLE patients, but Bax levels remains unaltered (53). In 2012, a study conducted with lupus nephritis (LN) patients, revealed a higher expression of Bax in LN tissues when compared to controls, suggesting that apoptosis might be induced through pathways regulated by these proteins in SLE (56). Moreover, we observed that SLE patients with moderate disease (active disease) had a lower frequency of CD4⁺ T cells

expressing Bcl-2 when compared to patients with inactive disease ($p=0.031$) indicating a relation with our previous results between cases and controls regarding the influence of decreased Bcl-2 expression in SLE. Differently, Miret *et al.* observed a significant correlation between Bcl-2 and SLEDAI ($p<0.001$) (57).

We also evaluated T cells expressing the p53 tumor suppressor protein in SLE patients and controls. p53 induces apoptosis through several mechanisms (58). When p53 binds to DNA, it activates the transcription of proapoptotic genes, such as Fas. Many studies have suggested that p53 can also induce apoptosis through the mitochondrial pathway (59, 60). Our data showed an increased frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing p53 in SLE patients compared to controls ($p=0.025$ and $p<0.001$ respectively). We also observed an increased number of CD8⁺ T cells expressing p53 in SLE patients with positivity for anti-DNA antibodies in relation to those who were negative to this marker ($p=0.02$), suggesting that the enhanced expression of p53 may increase apoptosis. Subsequently, the release of intracellular material from the apoptotic cells may cause an overproduction of autoantibodies. It was already reported that SLE development in humans is correlated with increased p53 levels in lymphocytes and defects in apoptosis mediated by p53 (61, 62). p53 is implicated in the control of the cell cycle through the stimulation of autoreactive cells apoptosis and Miret *et al.* reported that p53 plays a role not only in the pathogenesis, but also in SLE activity and that IL-10 may influence SLE activity by inhibiting the p53 and Bcl-2/Fas apoptosis pathway in autoreactive cells (57).

In addition to evaluating the expression of apoptosis-related proteins in different T cell subsets, we also addressed the frequency of initial apoptosis and cell death in SLE. In lymphocytes, the phosphatidylserine is located on the inner leaflet of the plasma membrane. During apoptosis occurs the translocation of phosphatidylserine to the outer

leaflet. Using Annexin V as an indicator of phosphatidylserine surface exposure in early apoptotic cells and 7-AAD staining as cell death indicator, we observed that SLE patients presented an increased frequency of lymphocytes death ($p=0.001$). However, whether these cells are late apoptotic or necrotic cells is still to be determined. Our findings are in accordance with a previous study demonstrating that the percentage of necrotic cells was higher in SLE patients comparing to controls. But, in contrast, this study revealed increased early apoptotic cells in patients with active disease and with inactive disease in relation to controls (28).

Finally, we performed analysis of apoptotic markers at the mRNA level to compare with the findings at protein level through the expression of *FAS*, *FASL*, *BCL-2*, *BAX* and *TP53* mRNA from PBMCs of SLE patients and controls. Our results showed a downregulation of antiapoptotic *BCL-2* in SLE patients ($p=0.02$), going to the same direction of the results at protein level, in which there was a lower frequency of $CD4^+$ T cells expressing Bcl-2. Recently, Rastin *et al.* observed significantly lower levels of *FASL* in SLE patients (18). Although we observed high levels of T cells expressing Fas, Bax and p53 in SLE patients, our genetic approaches did not revealed the same tendency. This fact could be attributed to two main causes: (1) defects in the clearance of apoptotic cells, which could result in accumulation of apoptotic cells (18, 63); (2) the gene modulation by therapy. An interesting work, evaluating large-scale differential gene expression in T cells from SLE patients with glomerulonephritis before and after immunosuppressive treatment, reported that *P53* gene was repressed in untreated patients and induced during treatment (64).

The main question of this work was to evaluate whether the frequency of Treg cells in SLE could be influenced by the expression of pro and antiapoptotic proteins. Although

our data showed an increased frequency of Treg cells in SLE patients, no differences regarding the expression of apoptosis related proteins were observed on this cell subpopulation. Thus, apoptosis may have a dual role in the pathogenesis of SLE. On one hand, this process might be beneficial in directing the deletion of self-reactive lymphocytes and maintenance of peripheral tolerance. In this sense, defects in apoptosis could lead to the persistence of autoreactive T or B cells. On the other hand, enhanced apoptosis could generate altered self-antigens which can stimulate autoantibodies production and triggers an autoimmune response (65).

In conclusion, we demonstrated differences in the repertoire of pro and antiapoptotic proteins that reflect an increase in the frequency of cell death, suggesting defects in the apoptosis pathways in SLE patients. Further, increased apoptosis could lead to a decrease in the CD4⁺ T cell repertoire and contribute to infection susceptibility, further increasing the risk for SLE development. Taking together, our results indicate that the apoptosis deregulation observed here may be associated with a deficient immune regulatory capacity in SLE. Further studies are needed to confirm our data in order to fully elucidate the molecular and cellular mechanisms by which abnormal apoptosis of T cells contributes to SLE pathology.

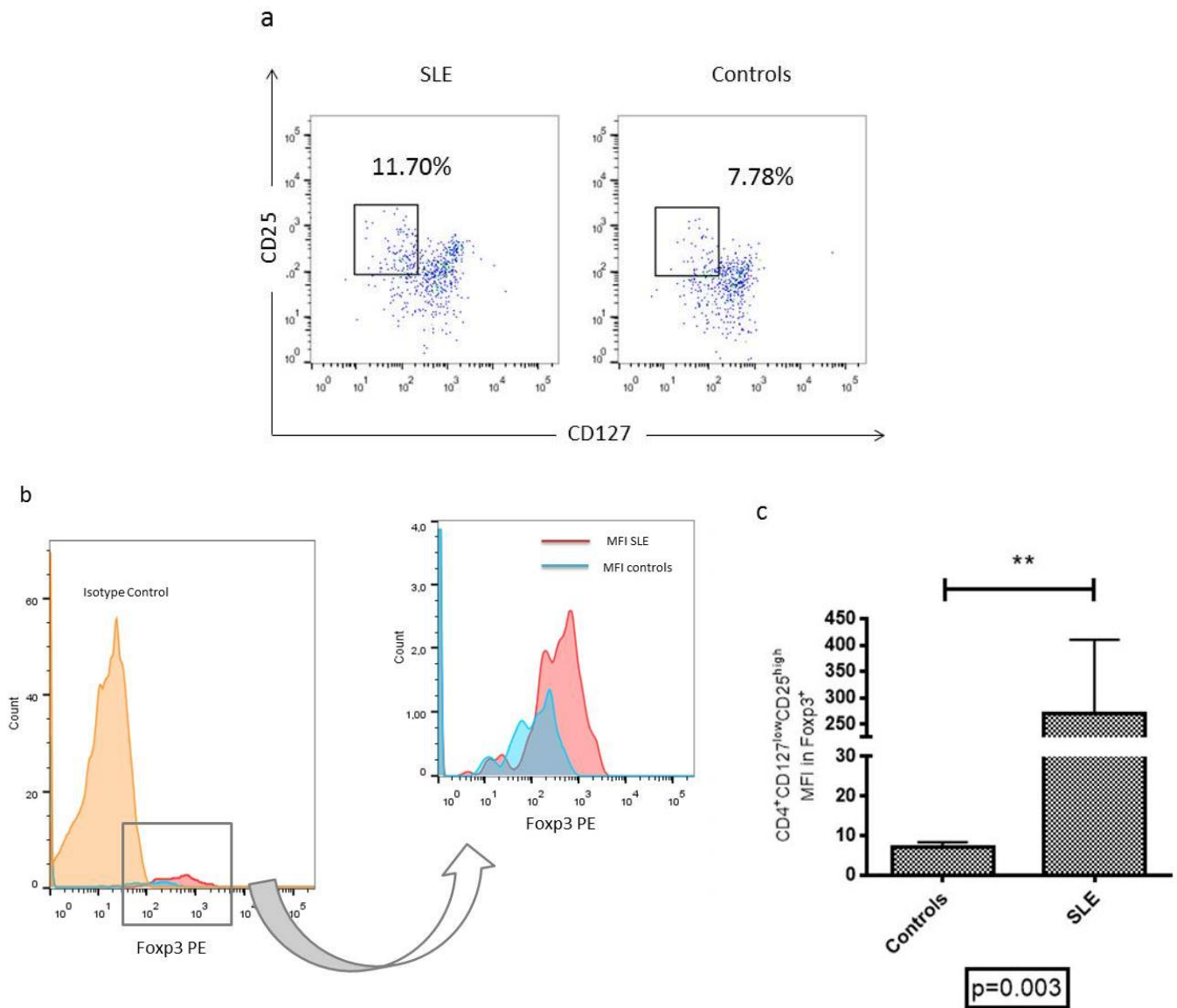


Figure 1. Frequency of natural Tregs and FoxP3 expression on PBMCs from SLE women patients and healthy women controls. We used specific antibodies against surface CD4, CD127, CD25 and intracellular Foxp3. Analysis of FoxP3 densities on Treg cells between SLE patients and healthy controls were also performed by flow cytometry. **(a)** The lymphocytes population was first defined. Dot plots were gated on CD4⁺ T cells from PBMCs (based on forward and side scatter and CD4 stained). CD127^{low}CD25^{high} were boxed, and the number in the dot plot represents the percentage of gated cells expressing the relevant markers. A higher frequency of CD4⁺CD127^{low}CD25^{high} cells from SLE women was observed when compared to healthy women ($p=0.001$). **(b)** Histogram of the area in which cells are CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} was created in order to determine the intensity of FoxP3 expression (estimated by MFI). **(c)** The results revealed high FoxP3 densities on Treg cells from SLE patients (MFI: 270.21 ± 139.74) when compared to controls (MFI: 7.03 ± 1.35 , ** $p<0.01$). The experiments are representative of measurements between: **(a)** 50 patients and 43 controls, **(b)** and **(c)** 34 patients and 24 controls.

MFI = mean of fluorescence intensity; **SLE** = systemic lupus erythematosus; **Tregs** = regulatory T cells.

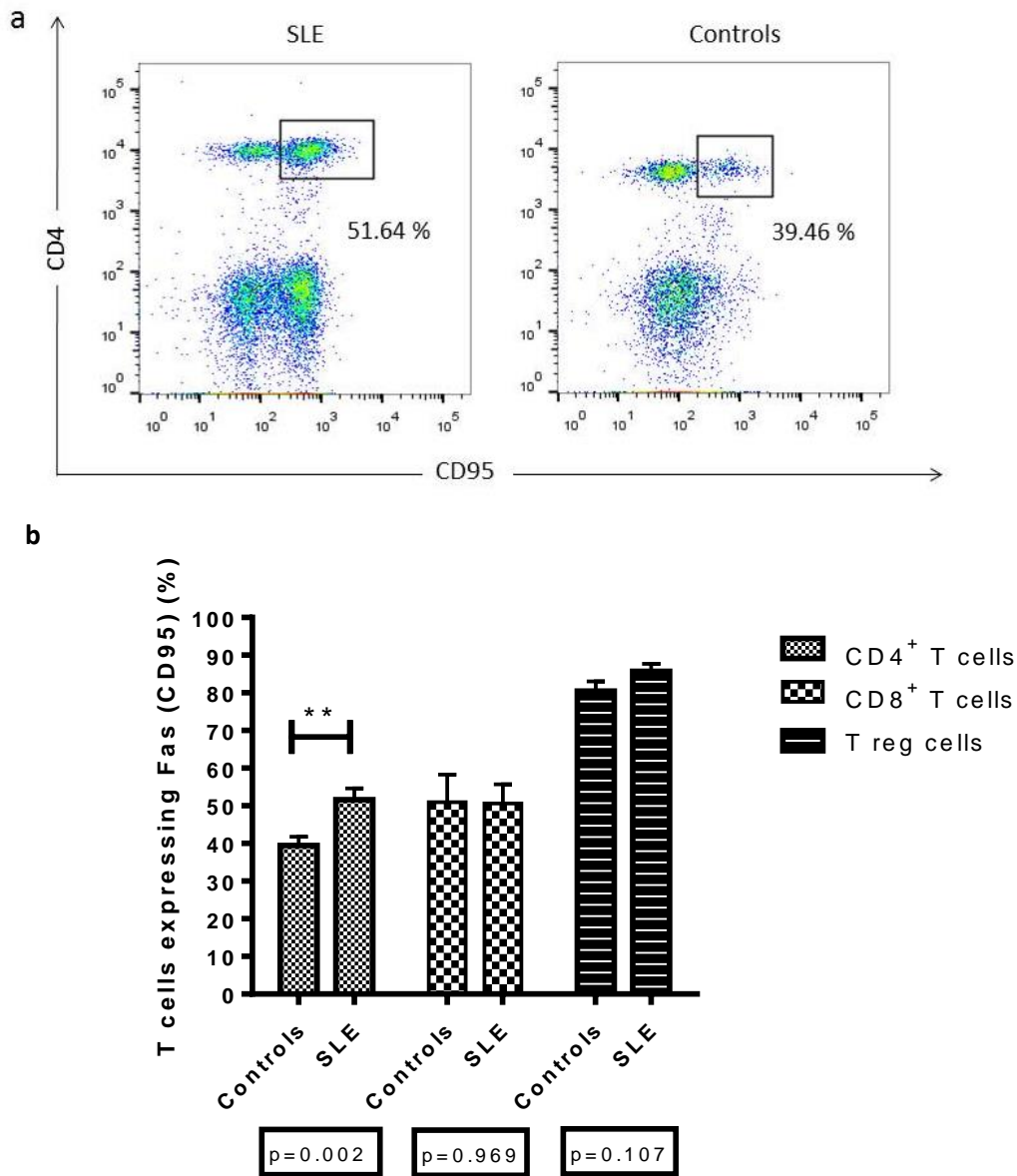


Figure 2. Frequencies of CD4⁺ T, CD8⁺T and Treg cells expressing Fas (CD95) between SLE women patients and healthy women controls. Dotplots defining the CD4⁺CD95⁺ and CD8⁺CD95⁺ cell populations were boxed. For analysis on Treg subpopulation, dot plots were gated on CD4⁺ T cells from lymphocytes and dotplots defining FoxP3⁺CD95⁺ in CD127^{low}CD25^{high}T cells were traced. (a) Dot plots were gated on CD4⁺CD95⁺ T cells and the number in the dot plot represents the percentage of gated cells expressing the relevant markers. (b) Women with SLE showed a higher frequency of CD4⁺ T cells expressing CD95 when compared to controls (51.64 ± 2.97 vs. 39.46 ± 2.30; **p<0.01). The experiments are representative of measurements between: (a) 50 patients and 50 controls, (b) 12 patients and 7 controls for CD8⁺T analysis and 34 patients and 24 controls for Treg analysis.

SLE = Systemic Lupus Erythematosus; Treg = regulatory T cells.

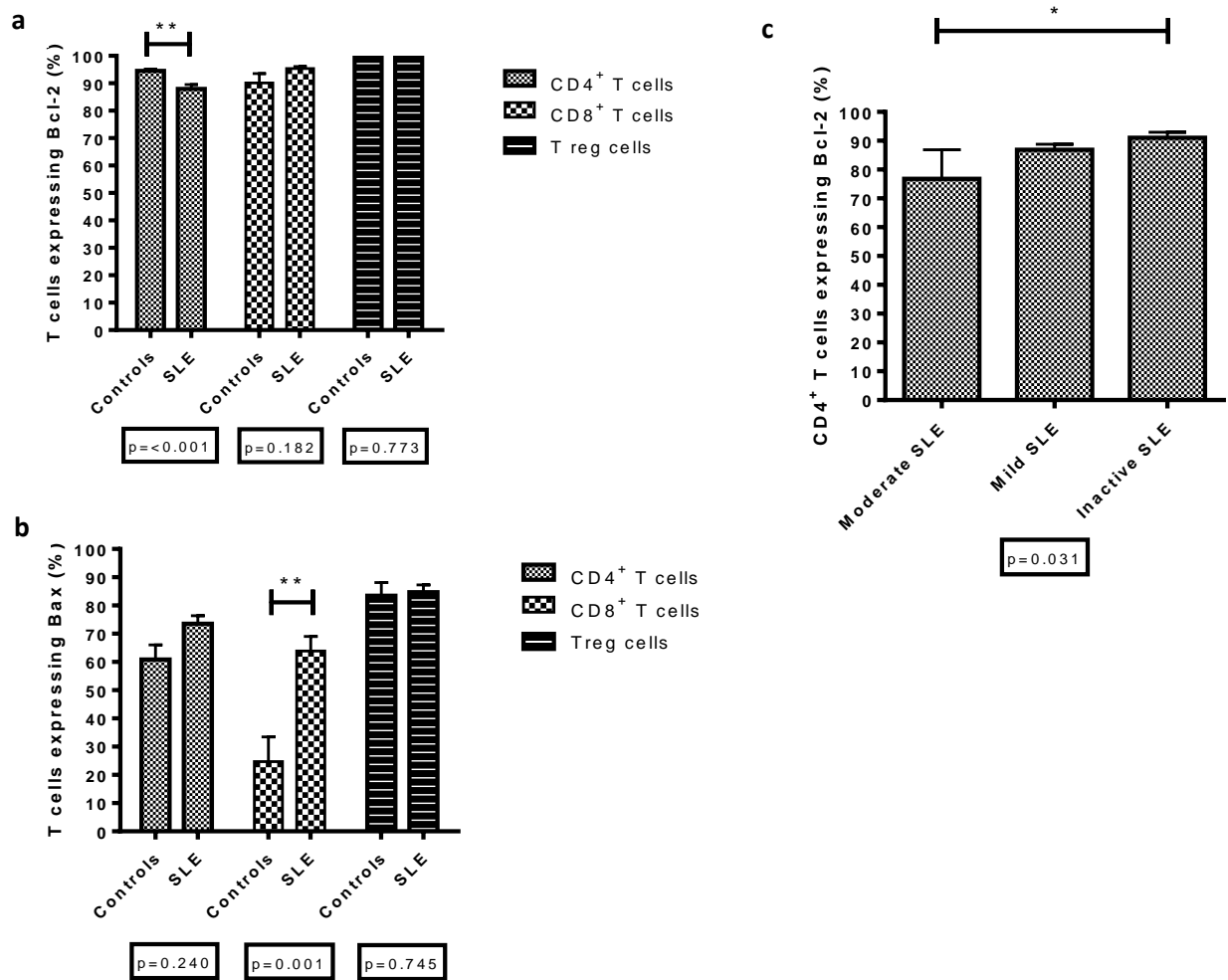


Figure 3. Frequencies of CD4⁺ T, CD8⁺T and Treg cells expressing Bcl-2 family intracellular proteins. Dotplots defining the CD4⁺Bcl-2⁺, CD8⁺Bcl-2⁺ and CD4⁺Bax⁺, CD8⁺Bax⁺ cell populations were boxed. For analysis on Treg subpopulations, dot plots were gated on CD4⁺ T cells from lymphocytes and dotplots defining FoxP3⁺Bcl-2⁺ and FoxP3⁺Bax⁺ in CD127^{low}CD25^{high} T cells were traced. (a) CD4⁺ T cells expressing antiapoptotic Bcl-2 was significantly decreased in SLE women compared to controls (87.96 ± 1.62 vs. 94.50 ± 0.68; **p<0.01). (b) We observed an increased number of CD8⁺ T cells expressing proapoptotic Bax protein in SLE women than controls (63.88 ± 5.16 vs. 24.71 ± 8.76; **p<0.01). (c) A statistically significant difference in the frequencies of CD4⁺ T cells expressing Bcl-2 between SLE patients according to SLEDAI was observed. SLE women patients with active (moderate) disease had a lower frequency of cells expressing Bcl-2 protein when compared to patients with inactive disease (76.80 ± 10.09 vs 91.05 ± 1.87; *p<0.05). The experiments are representative of measurements between: (a) 50 patients and 50 controls for CD4⁺ T analysis, 12 patients and 7 controls for CD8⁺T analysis and 34 patients and 24 controls for Treg analysis, (b) 50 patients and 50 controls for CD4⁺ T analysis, 12 patients and 7 controls for CD8⁺T analysis and 34 patients and 25 controls for Treg analysis, (c) 50 patients.

SLE = Systemic Lupus Erythematosus; **Treg** = regulatory T cells; **SLEDAI** = systemic lupus erythematosus disease activity index.

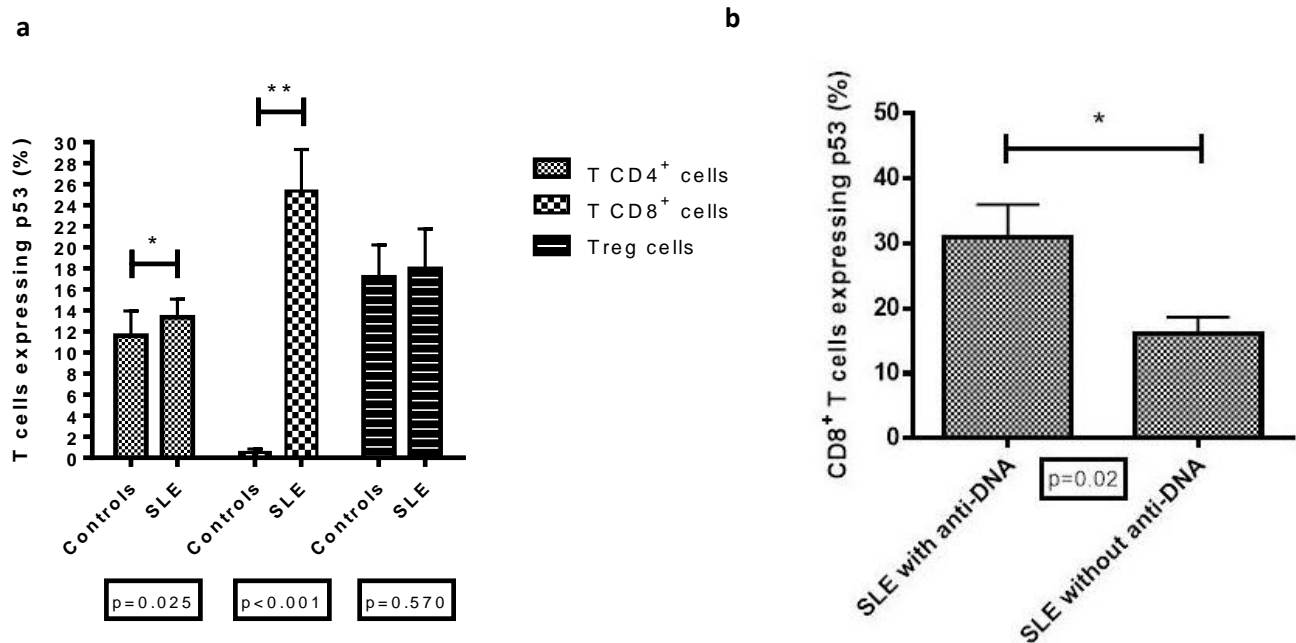


Figure 4. Frequencies of CD4⁺ T, CD8⁺ T and Treg cells expressing p53 intracellular protein. Dotplots defining the CD4⁺p53⁺, CD8⁺p53⁺ cell populations were boxed. For analysis on Treg subpopulation, dot plots were gated on CD4⁺ T cells from lymphocytes and dotplots defining FoxP3⁺p53⁺ in CD127^{low}CD25^{high} T cells were traced. **(a)** We observed a higher frequency of both CD4⁺ T and CD8⁺ T cells expressing p53 in SLE patients when compared to controls (13.35 ± 1.74 vs. 11.62 ± 2.34; *p<0.05 and 25.35 ± 3.95 vs. 0.5 ± 0.33; **p<0.01 respectively). **(b)** An increased proportion of CD8⁺ T cells expressing p53 in SLE patients with positivity for anti-DNA antibodies in relation to those without the antibodies presence was observed (31.06 ± 4.97 vs. 16.17 ± 2.50, *p<0.05). The experiments are representative of measurements between: **(a)** 50 patients and 50 controls for CD4⁺ T analysis, 12 patients and 7 controls for CD8⁺ T analysis and 34 patients and 26 controls for Treg analysis and **(b)** 11 patients.

SLE = Systemic Lupus Erythematosus; Tregs = regulatory T cells.

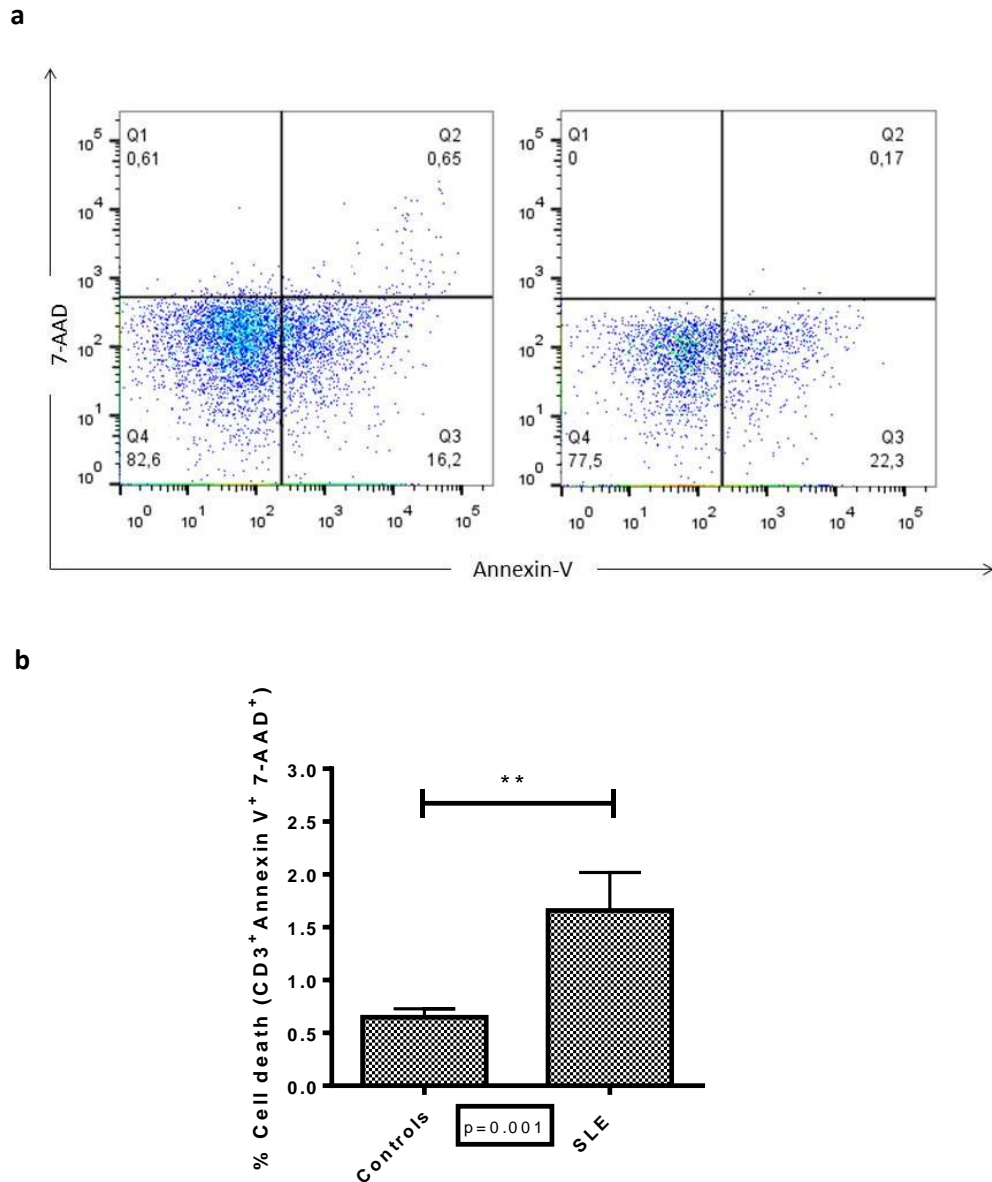


Figure 5. Early apoptosis and cell death of lymphocytes from SLE patients and controls. We identified early apoptotic cells using Annexin V binding as an indicator of phosphatidyl serine surface exposure and 7-AAD DNA staining as cell death indicator by flow cytometry. (a) Through the dot plots, we differentiated viable cells (lower left), early apoptotic cells (lower right), and cell death (upper left). (b) Our data showed that SLE women patients had an increased percentage of lymphocytes death (CD3⁺ Annexin V⁺ 7-AAD⁺) in comparison with control group (1.66 ± 0.36 vs. 0.65 ± 0.08; **p<0.01). No difference was found in relation to rate of early apoptotic cells (CD3⁺ Annexin V⁺ 7-AAD⁻) between the groups. The experiments are representative of measurements between: (a) and (b) 47 patients and 50 controls.

SLE = Systemic Lupus Erythematosus 7-AAD = 7-Amino-Actinomycin-D

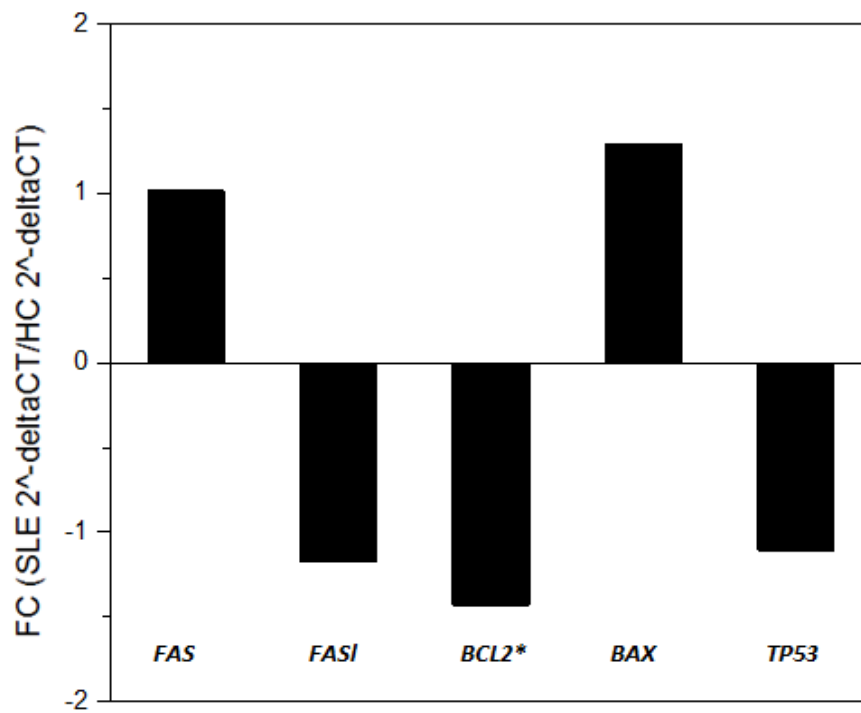


Figure 6. Target genes expression in SLE patients comparing with healthy controls using real-time quantitative PCR. The results were normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) expression. Target genes expression in healthy controls is normalized to 1 (not reported in the graph). * $p < 0.05$.

REFERENCES

1. Yan B, Ye S, Chen G, Kuang M, Shen N, Chen S. Dysfunctional CD4⁺,CD25⁺ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon-alpha-producing antigen-presenting cells. *Arthritis Rheum.* 2008;58(3):801-12.
2. Ohl K, Tenbrock K. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol.* 2015;45(2):344-55.
3. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):523-32.
4. Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD, et al. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature.* 2007;445(7130):931-5.
5. Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L, et al. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *The Journal of clinical investigation.* 2006;116(6):1713-22.
6. Levings MK, Allan S, d'Hennezel E, Piccirillo CA. Functional dynamics of naturally occurring regulatory T cells in health and autoimmunity. *Adv Immunol.* 2006;92:119-55.
7. Yu N, Li X, Song W, Li D, Yu D, Zeng X, et al. CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾CD127^(low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood. *Inflammation.* 2012;35(6):1773-80.
8. Liu Z, Davidson A. Taming lupus-a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nature medicine.* 2013;18(6):871-82.
9. D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Systemic lupus erythematosus. *Lancet.* 2007;369(9561):587-96.

10. Yates J, Whittington A, Mitchell P, Lechler RI, Lightstone L, Lombardi G. Natural regulatory T cells: number and function are normal in the majority of patients with lupus nephritis. *Clin Exp Immunol.* 2008;153(1):44-55.
11. Liu MF, Wang CR, Fung LL, Wu CR. Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol.* 2004;59(2):198-202.
12. Bonelli M, Savitskaya A, Steiner CW, Rath E, Smolen JS, Scheinecker C. Phenotypic and functional analysis of CD4+ CD25- Foxp3+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2009;182(3):1689-95.
13. Zhang B, Zhang X, Tang FL, Zhu LP, Liu Y, Lipsky PE. Clinical significance of increased CD4+CD25-Foxp3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(7):1037-40.
14. Horwitz DA. Identity of mysterious CD4+CD25-Foxp3+ cells in SLE. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(1):101.
15. Mesquita D, Jr., Cruvinel WM, Araujo JA, Salmazi KC, Kallas EG, Andrade LE. Imbalanced expression of functional surface molecules in regulatory and effector T cells in systemic lupus erythematosus. *Braz J Med Biol Res.* 2014;47(8):662-9.
16. Magna M, Pisetsky DS. The Role of Cell Death in the Pathogenesis of SLE: Is Pyroptosis the Missing Link? *Scand J Immunol.* 2015.
17. Bouts YM, Wolthuis DF, Dirx MF, Pieterse E, Simons EM, van Boekel AM, et al. Apoptosis and NET formation in the pathogenesis of SLE. *Autoimmunity.* 2012;45(8):597-601.

18. Rastin M, Mahmoudi M, Hatef M, Sahebari M, Tabasi N, Haghmorad D, et al. T lymphocyte apoptosis in systemic lupus erythematosus patients. *Iran J Basic Med Sci.* 2013;16(8):936-41.
19. Jung JY, Suh CH. Incomplete clearance of apoptotic cells in systemic lupus erythematosus: pathogenic role and potential biomarker. *Int J Rheum Dis.* 2015;18(3):294-303.
20. Navratil JS, Ahearn JM. Apoptosis, clearance mechanisms, and the development of systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep.* 2001;3(3):191-8.
21. Cohen PL. Apoptotic cell death and lupus. *Springer Semin Immunopathol.* 2006;28(2):145-52.
22. Yang X, Sun B, Wang H, Yin C, Wang X, Ji X. Increased serum IL-10 in lupus patients promotes apoptosis of T cell subsets via the caspase 8 pathway initiated by Fas signaling. *J Biomed Res.* 2015;29(3):232-40.
23. Liphhaus BL, Kiss MH. The role of apoptosis proteins and complement components in the etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clinics (Sao Paulo).* 2009;65(3):327-33.
24. Wang H, Xu J, Ji X, Yang X, Sun K, Liu X, et al. The abnormal apoptosis of T cell subsets and possible involvement of IL-10 in systemic lupus erythematosus. *Cell Immunol.* 2005;235(2):117-21.
25. Wirleitner B, Obermoser G, Bock G, Neutrauer G, Schennach H, Sepp N, et al. Induction of apoptosis in human blood T cells by 7,8-dihydroneopterin: the difference between healthy controls and patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2003;107(3):152-9.

26. Wu J, Metz C, Xu X, Abe R, Gibson AW, Edberg JC, et al. A novel polymorphic CAAT/enhancer-binding protein beta element in the FasL gene promoter alters Fas ligand expression: a candidate background gene in African American systemic lupus erythematosus patients. *J Immunol.* 2003;170(1):132-8.
27. Bijl M, Horst G, Limburg PC, Kallenberg CG. Fas expression on peripheral blood lymphocytes in systemic lupus erythematosus (SLE): relation to lymphocyte activation and disease activity. *Lupus.* 2001;10(12):866-72.
28. Xue C, Lan-Lan W, Bei C, Jie C, Wei-Hua F. Abnormal Fas/FasL and caspase-3-mediated apoptotic signaling pathways of T lymphocyte subset in patients with systemic lupus erythematosus. *Cell Immunol.* 2006;239(2):121-8.
29. Tischner D, Gaggl I, Peschel I, Kaufmann M, Tuzlak S, Drach M, et al. Defective cell death signalling along the Bcl-2 regulated apoptosis pathway compromises Treg cell development and limits their functionality in mice. *J Autoimmun.* 2012;38(1):59-69.
30. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1725.
31. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006;4(2):295-306.
32. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(6):554-8.
33. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating

Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996;39(3):363-9.

34. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.* 1992;35(6):630-40.

35. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.

36. Kuhn A, Beissert S, Krammer PH. CD4(+)CD25 (+) regulatory T cells in human lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res.* 2009;301(1):71-81.

37. Shenghui Z, Yixiang H, Jianbo W, Kang Y, Laixi B, Yan Z, et al. Elevated frequencies of CD4(+) CD25(+) CD127^{lo} regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Int J Cancer.* 2010;129(6):1373-81.

38. Venigalla RK, Tretter T, Krienke S, Max R, Eckstein V, Blank N, et al. Reduced CD4⁺,CD25⁻ T cell sensitivity to the suppressive function of CD4⁺,CD25^{high},CD127⁻/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2008;58(7):2120-30.

39. Gerli R, Nocentini G, Alunno A, Bocci EB, Bianchini R, Bistoni O, et al. Identification of regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* 2009;8(5):426-30.

40. Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(12):849-59.

41. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2005;175(12):8392-400.

42. Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 2003;21(3):273-6.
43. Alvarado-Sanchez B, Hernandez-Castro B, Portales-Perez D, Baranda L, Layseca-Espinosa E, Abud-Mendoza C, et al. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 2006;27(2):110-8.
44. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 2009;30(6):899-911.
45. Azab NA, Bassyouni IH, Emad Y, Abd El-Wahab GA, Hamdy G, Mashahit MA. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells (TREG) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: the possible influence of treatment with corticosteroids. *Clin Immunol.* 2008;127(2):151-7.
46. Suarez A, Lopez P, Gomez J, Gutierrez C. Enrichment of CD4⁺ CD25^{high} T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(11):1512-7.
47. Zhang B, Zhang X, Tang F, Zhu L, Liu Y. Reduction of forkhead box P3 levels in CD4⁺CD25^{high} T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2008;153(2):182-7.
48. Chen X, Murakami T, Oppenheim JJ, Howard OM. Differential response of murine CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25⁻ T cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur J Immunol.* 2004;34(3):859-69.
49. Chen X, Wang LL, Cai B, Chen J, Feng WH. [Role of Fas-FasL and caspase-3 signal transduction pathway in promoting apoptosis of T lymphocyte subset in SLE patients]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2006;22(5):588-90.

50. Liphhaus BL, Kiss MH, Carrasco S, Goldenstein-Schainberg C. Increased Fas and Bcl-2 expression on peripheral blood T and B lymphocytes from juvenile-onset systemic lupus erythematosus, but not from juvenile rheumatoid arthritis and juvenile dermatomyositis. *Clin Dev Immunol.* 2006;13(2-4):283-7.
51. Bossaller L, Rathinam VA, Bonegio R, Chiang PI, Busto P, Wespiser AR, et al. Overexpression of membrane-bound fas ligand (CD95L) exacerbates autoimmune disease and renal pathology in pristane-induced lupus. *J Immunol.* 2013;191(5):2104-14.
52. Falcini F, Azzari C, Gelli VA, Luchetti M, Gabrielli A, Calzolari A, et al. Reduction of bcl-2 in T cells during immunosuppressive therapy in patients with severe juvenile onset systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 1999;93(1):59-64.
53. Graninger WB, Steiner CW, Graninger MT, Aringer M, Smolen JS. Cytokine regulation of apoptosis and Bcl-2 expression in lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Cell Death Differ.* 2000;7(10):966-72.
54. Aringer M, Wintersberger W, Steiner CW, Kiener H, Presterl E, Jaeger U, et al. High levels of bcl-2 protein in circulating T lymphocytes, but not B lymphocytes, of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1994;37(10):1423-30.
55. Ohsako S, Hara M, Harigai M, Fukasawa C, Kashiwazaki S. Expression and function of Fas antigen and bcl-2 in human systemic lupus erythematosus lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994;73(1):109-14.
56. Cui JH, Qiao Q, Guo Y, Zhang YQ, Cheng H, He FR, et al. Increased apoptosis and expression of FasL, Bax and caspase-3 in human lupus nephritis class II and IV. *J Nephrol.* 2012;25(2):255-61.

57. Miret C, Font J, Molina R, Garcia-Carrasco M, Filella X, Ramos M, et al. Relationship of oncogenes (sFas, Bcl-2) and cytokines (IL-10, alfa-TNF) with the activity of systemic lupus erythematosus. *Anticancer Res.* 2001;21(4B):3053-9.
58. Chipuk JE, Green DR. Cytoplasmic p53: bax and forward. *Cell Cycle.* 2004;3(4):429-31.
59. Xin H, D'Souza S, Jorgensen TN, Vaughan AT, Lengyel P, Kotzin BL, et al. Increased expression of Ifi202, an IFN-activatable gene, in B6.Nba2 lupus susceptible mice inhibits p53-mediated apoptosis. *J Immunol.* 2006;176(10):5863-70.
60. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell.* 2003;11(3):577-90.
61. Rathmell JC, Thompson CB. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell.* 2002;109 Suppl:S97-107.
62. Miret C, Molina R, Filella X, Garcia-Carrasco M, Claver G, Ingelmo M, et al. Relationship of p53 with other oncogenes, cytokines and systemic lupus erythematosus activity. *Tumour Biol.* 2003;24(4):185-8.
63. Gaipf US, Munoz LE, Grossmayer G, Lauber K, Franz S, Sarter K, et al. Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J Autoimmun.* 2007;28(2-3):114-21.
64. Pereira E, Tamia-Ferreira MC, Cardoso RS, Mello SS, Sakamoto-Hojo ET, Passos GA, et al. Immunosuppressive therapy modulates T lymphocyte gene expression in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology.* 2004;113(1):99-105.
65. Su DL, Wang HJ, Ji XH, Li YY, Xuan HB, Heng C, et al. Mycophenolic acid inhibits SLE-associated cytokine expression and promotes apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Acta pharmacologica Sinica.* 2006;27(8):1051-7.

Table 1. Demographic, clinical and laboratorial features of SLE patients.

Patient's features	% (n)
Age (years)	42.18 ± 10.51(50)
Ethnicity	
European-derived	74% (37)
Age of symptoms (years)	28.66 ± 11.23 (47)
Age at diagnosis (years)	31.24 ± 11.69 (49)
Malar rash	68% (34)
Discoid rash	4% (2)
Photosensitivity	74% (37)
Oral or nasal ulcers	38% (19)
Arthritis	74% (37)
Serositis	20% (10)
Pleurisy	14.3% (7)
Pericarditis	10.2% (5)
Nephritis	46% (23)
classe II	8.7% (2)
classe III	26.1% (6)
classe IV	21.7% (5)
classe V	13.0% (3)
classe VI	4.3% (1)
sem biópsia	26.1% (6)
Neurologic disorders	10% (5)
Hematologic disorders	82% (41)
Hemolytic anemia	30% (15)
Leukopenia/lymphopenia	56% (28)
Thrombocytopenia	30% (15)
Immunologic disorders	78.3% (36)
Anti-dsDNA	54.2% (26)
Anti-Sm	15.2% (7)
Anticardiolipin	34.8% (16)
Lupus anticoagulant	19.6% (9)
False-positive VDRL	2.2% (1)
FAN	100% (50)
Anti-Ro/SSA	39.1% (18)
Anti-La/SSB	6.5% (3)
Anti-RNP	28.3% (13)
Anti-Scl 70	2.2% (1)
Sjögren syndrome	4.4% (2)
APS	9.1% (4)
SLEDAI	
moderate SLE (SLEDAI = 6-10)	10% (5)
mild SLE (SLEDAI = 1-5)	40% (20)
inactive SLE (SLEDAI = 0)	50% (25)
SLICC ^a	0 (0-4) (46)
Antimalarial use ^b	84% (42)
Immunosuppressive use	60% (30)
glucocorticoids	34% (17)
cyclophosphamide	16% (8)
methotrexate	6% (3)
azathioprine	32% (16)
mycophenolate mofetil	8% (4)
rituximab	2% (1)

ANA: antinuclear antibody; APS: secondary antiphospholipid syndrome; SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; SLICC: systemic lupus international collaborating clinics; VDRL: venereal disease research laboratory test. ^amedian (minimum-maximum).^bAntimalarials: chloroquine and hydroxychloroquine. Age: mean ± standard deviation.

Table 2. Immunophenotyping of PBMCs from SLE patients and healthy blood donors women.

Frequency (%)	SLE (mean ± SE)	Healthy (mean ± SE)	p- value
Treg	11.70 ± 1.00	7.78 ± 0.49	0.001^a
CD4 ⁺ CD127 ^{low} CD25 ^{high} (MFI in FoxP3)	270.21 ± 139.74	7.03 ± 1.35	0.003^b
CD4 ⁺ CD95 ⁺	51.64 ± 2.97	39.46 ± 2.30	0.002^a
CD8 ⁺ CD95 ⁺	50.62 ± 5.06	50.96 ± 7.29	0.969 ^a
CD4 ⁺ CD127 ^{low} CD25 ^{high} FoxP3 ⁺ CD95 ⁺	85.74 ± 2.0	80.42 ± 2.62	0.107 ^a
CD3 ⁺ CD178 ⁺	3.40 ± 0.43	5.44 ± 0.98	0.749 ^b
CD4 ⁺ CD178 ⁺	6.57 ± 1.03	10.54 ± 2.27	0.376 ^b
CD8 ⁺ CD178 ⁺	1.1 ± 0.19	1.2 ± 0.31	0.091 ^b
CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺ CD178 ⁺	7.14 ± 1.39	11.23 ± 3.38	0.264 ^b
CD4 ⁺ p53 ⁺	13.35 ± 1.74	11.62 ± 2.34	0.025^b
CD8 ⁺ p53 ⁺	25.35 ± 3.95	0.5 ± 0.33	<0.001^a
CD4 ⁺ CD127 ^{low} CD25 ^{high} FoxP3 ⁺ p53 ⁺	17.95 ± 3.80	17.17 ± 3.07	0.570 ^b
CD4 ⁺ Bax ⁺	73.57 ± 2.81	60.91 ± 5.09	0.240 ^b
CD8 ⁺ Bax ⁺	63.88 ± 5.16	24.71 ± 8.76	0.001^a
CD4 ⁺ CD127 ^{low} CD25 ^{high} FoxP3 ⁺ Bax ⁺	84.70 ± 2.62	83.46 ± 4.64	0.745 ^b
CD4 ⁺ Bcl2 ⁺	87.96 ± 1.62	94.50 ± 0.68	<0.001^b
CD8 ⁺ Bcl2 ⁺	95.39 ± 0.73	90.14 ± 3.44	0.182 ^a
CD4 ⁺ CD127 ^{low} CD25 ^{high} FoxP3 ⁺ Bcl2 ⁺	99.95 ± 0.04	99.97 ± 0.02	0.773 ^b
Early apoptotic cells (CD3 ⁺ Annexin V ⁺)	29.64 ± 1.60	31.75 ± 1.58	0.351 ^a
Death cell (CD3 ⁺ Annexin V ⁺ 7-AAD ⁺)	1.66 ± 0.36	0.65 ± 0.08	0.001^b

^aStudent's t test.

^bMann-Whitney non-parametric test.

Table 3. Frequencies of T CD4⁺ cells expressing Bcl-2 and CD4⁺CD127^{low}CD25^{high} according to SLEDAI in SLE patients.

Frequency (%)	Inactive SLE n=25 (mean ± SE)	Mild SLE n=20 (mean ± SE)	Moderate SLE n=5 (mean ± SE)	p-value
CD4 ⁺ Bcl2 ⁺	91.05 ± 1.87	86.89 ± 1.91	76.80 ± 10.09	0.031^a
CD4 ⁺ CD127 ^{low} CD25 ^{high}	10.22 ± 5.72	12.54 ± 6.37	15.78 ± 13.60	0.223 ^a

^aKruskall Wallis test.

CAPÍTULO 6
DISCUSSÃO

CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO

Apesar do grande número de estudos já realizados, a causa precisa do lúpus eritematoso sistêmico (LES) ainda permanece por ser desvendada. Sabe-se que a sua patogênese é determinada por múltiplos fatores, e a perda da tolerância imunológica pode ser atribuída à interação de fatores genéticos, além de influências do ambiente (Borchers *et al.*, 2010; Crispin *et al.*, 2010; Ghodke-Puranik & Niewold, 2015). No contexto do LES, a desregulação de células T e B pode gerar a produção excessiva de autoanticorpos e a formação de imunocomplexos contra diferentes antígenos nucleares (Moudi *et al.*, 2013). O resultado é a deposição destes complexos imunes nos tecidos, causando inflamação sistêmica e dano a múltiplos órgãos (Achour *et al.*, 2010; Kyttaris *et al.*, 2006; Monticielo *et al.*, 2008).

As células T periféricas constituem várias subpopulações celulares funcionalmente distintas (efetoras, regulatórias e de memória) e estes vários subgrupos desempenham um importante papel no controle das respostas imunológicas. As células T regulatórias (Treg), por exemplo, têm sido intensamente estudadas em função da sua importante contribuição para o controle da homeostase imunológica, impondo seu efeito imunossupressor na ativação de células T efetoras (Singh *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2008). Qualquer anormalidade na função desempenhada por estas células pode levar a um distúrbio da tolerância imunológica periférica, resultando em uma resposta imune exacerbada e no desenvolvimento da autoimunidade (Kuhn *et al.*, 2009; Shenghui *et al.*, 2010; Tischner *et al.*, 2012). Um dos mecanismos envolvidos em assegurar um repertório de linfócitos competente e não-autorreativo é conhecido como apoptose ou morte celular programada. Uma vez desregulado este processo, pode ocorrer um desbalanço de células T helper e/ou Treg, além de longevidade anormal de células B e T, resultando em desordem do sistema imunológico, com potencial para o desenvolvimento de uma doença autoimune, como o LES (Eguchi, 2001; Tischner *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2005). Diversos estudos têm relatado que, no lúpus, subpopulações de células T apresentam anormalidades no processo de morte celular programada e que este fato poderia relacionar-se com o desenvolvimento da doença. A insuficiente ou excessiva apoptose de células circulantes, bem como um atraso no *clearance* de células apoptóticas por fagócitos já foram observados em pacientes com LES (Andrade *et al.*, 2000; Green, 2003; Rastin *et al.*, 2013; Ren *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). A regulação da apoptose é complexa e pode ocorrer em múltiplos níveis,

incluindo regulação em nível de expressão gênica e proteica de receptores de morte e seus ligantes, proteínas pro e antiapoptóticas, assim como em nível de modulação de componentes de sinalização intracelular (Eguchi, 2001). Embora nosso conhecimento a respeito da apoptose no LES tenha avançado nos últimos anos, ainda não é totalmente compreendido como as anormalidades observadas nas vias apoptóticas desencadeiam o processo autoimune. Por essa razão, realizamos uma ampla análise imunogenética através de diferentes abordagens, a fim de elucidar algumas das anormalidades que ocorrem na regulação apoptótica, tanto em nível genético quanto proteico, e buscar o entendimento de como estas alterações influenciam no desenvolvimento do LES.

No primeiro artigo desta tese, investigamos o papel de polimorfismos nos genes reguladores da apoptose *FAS*, *FASL*, *BCL-2* e *BAX* na susceptibilidade e em relação a características clínicas do LES. Como a maioria dos polimorfismos estudados nestes genes estão localizados em regiões reguladoras da transcrição, estes podem exercer efeitos fundamentais na expressão de genes/proteínas. Trabalhos já foram realizados na tentativa de esclarecer o papel destes genes na predisposição ao LES, mas a maioria deles não contempla polimorfismos em mais de um gene regulador da apoptose e os estudos publicados investigando a importância destes genes individualmente no LES apresentam resultados controversos (Bengtsson *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 1999; Huang & Manolios, 2000; Lee *et al.*, 2001a; Liphaut & Kiss, 2010; Moudi *et al.*, 2013). Essa controvérsia poderia ser atribuída às populações avaliadas, cujas origens étnicas são muitas vezes distintas e devido à heterogeneidade genética e clínica dos pacientes. Além disso, também podem ser uma consequência do pequeno tamanho amostral ou do baixo poder estatístico das amostras em questão (Xiang *et al.*, 2013).

Os resultados mais relevantes das análises das variantes polimórficas (**capítulo 4**) mostraram que pacientes afrodescendentes apresentaram uma maior frequência da variante alélica *C*, localizada na região promotora -844 do gene *FASL*, bem como do genótipo *CC* (**tabela 3 - capítulo 4**), indicando uma possível associação da expressão aumentada de FasL, conferida por esta variante, com a ocorrência de LES. Pacientes com o genótipo *CC* são cerca de 4,5 vezes mais susceptíveis a desenvolver a doença do que pacientes com o genótipo *TT*. Sugere-se que células T ativadas expressando realçados níveis de FasL sejam indutoras de apoptose em células T, B e células apresentadoras de antígenos, acelerando o processo de apoptose através da interação de TCR e CD28. Um estudo relatou que FasL

pode diretamente transduzir sinais envolvidos na morte celular para as células T e que órgãos que expressam Fas, como fígado, tireóide e pâncreas, são susceptíveis a dano mediado por Fas/FasL durante doenças autoimunes. O excesso de linfócitos apoptóticos, somado a uma possível remoção prejudicada dos materiais derivados da apoptose por fagócitos, contribuiria para a hiperatividade de células B, levando à produção exacerbada de autoanticorpos, característicos do LES (Chen *et al.*, 2005; Desbarats *et al.*, 1998). Indo na mesma direção dos nossos achados, estudos com iranianos, afro-americanos e taiwaneses também mostraram frequência aumentada do genótipo CC nos pacientes com LES quando comparados a controles. Portanto, especula-se que a variação gênica no promotor de *FASL* é um dos fatores genéticos extremamente complexos que contribuem para a patogênese do LES (Chen *et al.*, 2005; Moudi *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2003).

Embora não tenhamos encontrado qualquer influência do polimorfismo *FASL IVS2nt-124A/G* na susceptibilidade ao LES, observamos uma possível relação do haplótipo de variantes dos dois polimorfismos de *FASL* na doença em afrodescendentes (**tabela 4 – capítulo 4**). Encontramos uma maior frequência do haplótipo *FASL -844C/FASL IVS2NT-124A* em pacientes lúpicos afrodescendentes, que confere 2,3 vezes maior predisposição ao LES nestes indivíduos do que naqueles apresentando o haplótipo T/A. Desse modo, nossos dados apoiam a importância de se considerar o efeito conjunto de variantes gênicas que estão em desequilíbrio de ligação, mais do que a variante agindo individualmente no contexto das doenças (Nolsoe *et al.*, 2005). Embora existam relatos sobre o possível efeito de polimorfismos no gene *FASL* na susceptibilidade a doenças autoimunes, não se encontram descrições a respeito da relação entre o polimorfismo *FASL IVS2nt-124A/G* e o LES. Em 1996, o primeiro relato de uma apoptose mediada por *FASL* prejudicada, relacionada a uma mutação neste gene, foi descrito em apenas um paciente com LES, que exibia linfadenopatia (de um total de 75 pacientes). Mutações em *FASL* foram, então, consideradas causa incomum de LES (Wu *et al.*, 1996). A seguir, em 2000, os resultados de um estudo japonês, avaliando mutação no gene *FASL* em pacientes lúpicos, sugeriu que defeitos moleculares neste gene não estavam entre os principais fatores desencadeadores do LES (Kojima *et al.*, 2000). No entanto, esse cenário tem sofrido mudanças, de forma que polimorfismos em *FASL* vêm sendo alvos de vários estudos em doenças autoimunes, mostrando resultados interessantes como os nossos (Mohammadzadeh *et al.*, 2012; Stuck *et al.*, 2003; Yildir *et al.*, 2013).

Nossos resultados também mostraram que a baixa frequência do genótipo *BAX -248GA*, assim como do alelo A, nos pacientes afrodescendentes, curiosamente sugere um papel protetor da variante A contra o desenvolvimento da doença no grupo de origem africana (**tabela 5 – capítulo 4**). Este é o primeiro relato de uma associação entre SNPs no gene *BAX* e o LES. A variante polimórfica *BAX -248A* está relacionada com a expressão diminuída da proteína e, conseqüentemente, com uma eficiência apoptótica reduzida. Assim, acreditamos que a menor expressão desta variante nos pacientes afrodescendentes possa estar contribuindo, pelo menos em parte, para evitar um atraso na apoptose, ou seja, evitar que células que deveriam morrer por apoptose, não o façam. Assim, isso iria prevenir que células autorreativas permanecessem na circulação periférica por tempo prolongado. No entanto, devemos levar em consideração o fato de que o tamanho amostral deste grupo é pequeno, o que pode ser considerado uma limitação do estudo. Um trabalho envolvendo pacientes com osteomielite mostrou que o genótipo AA foi mais frequente nos pacientes e foi associado com mais baixa expressão da proteína Bax, quando comparados aos indivíduos apresentando outros genótipos (Ocana *et al.*, 2007). Além disso, *BAX-248G/A* tem sido implicado no risco de câncer e na falha em se alcançar a completa resposta ao tratamento (Fegan *et al.*, 2006; Saxena *et al.*, 2002). Embora muitas vezes o efeito de variantes gênicas na susceptibilidade à doença não seja observado e, ainda que nós não tenhamos evidenciado associações entre os polimorfismos de genes de apoptose e as manifestações clínicas da doença após a correção para múltiplas comparações (**tabela 6 – capítulo 4**), muitos estudos têm discutido algumas associações encontradas entre as frequências de variantes polimórficas e as características clínicas dos pacientes. Por exemplo, anticorpos anti-RNP foram associados com a presença do alelo *FAS -670A* e do genótipo *FAS -670AA* em um estudo com coreanos lúpicos (Lee *et al.*, 2001a). Este resultado está de acordo com os dados de outro estudo, que avaliou pacientes mexicanos mestiços. Neste último, o polimorfismo *FAS -670A/G* foi associado com algumas especificidades de ANA (Bollain *et al.*, 2014). Já em pacientes australianos, não foi encontrada associação entre os genótipos e o LES, mas o genótipo *FAS -670AA* foi associado com fotossensibilidade e úlceras orais (Huang *et al.*, 1999). Apoiando nossos resultados, Chen *et al.*, procurando possíveis influências dos polimorfismos no promotor de *FASL* com características clínicas do LES, não observaram diferenças na distribuição das variantes do promotor de *FASL* entre pacientes com LES com relação às manifestações

clínicas e achados sorológicos (Chen *et al.*, 2005). Isso nos mostra que polimorfismos podem ser importantes não só no risco de desenvolver alguma condição, mas podem também atuar como moduladores da doença e contribuir com subfenótipos dentro da doença.

No segundo artigo da tese, que incluiu análises de expressão gênica e proteica, discutimos, através de uma abordagem mais ampla, a possível influência dos diferentes níveis de expressão de marcadores de apoptose no comportamento das células do sistema imunológico (T CD4⁺, T CD8⁺ e Treg) e, conseqüentemente, na desregulação apoptótica e perda da autotolerância no LES. Os estudos da literatura que fornecem uma visão mais abrangente quanto à expressão desses genes e proteínas em células T de pacientes com LES ainda são escassos e também apresentam resultados discordantes (Bijl *et al.*, 2001; Graninger *et al.*, 2000; Rastin *et al.*, 2013; Saenz-Corral *et al.*, 2015). Além disso, vale citar que o grande diferencial no nosso trabalho foi a investigação do perfil de expressão de proteínas reguladoras da apoptose na subpopulação de células Treg, que regulam a ativação de células T, importantes no reconhecimento e diferenciação de antígenos próprios de não-próprios. As células Treg têm papel central na manutenção da autotolerância e no controle da autoimunidade, e muitas desordens autoimunes são associadas com função reduzida ou diminuída sobrevivência de Treg (Huan *et al.*, 2005; Tischner *et al.*, 2012). Dessa forma, a capacidade de sobrevivência deste subgrupo de células ou fatores que afetem este processo são considerados críticos para a prevenção da autoimunidade. Entretanto, os mecanismos responsáveis pelo controle da sobrevivência das células Treg permanecem ainda pouco compreendidos (Kuhn *et al.*, 2009; Shenghui *et al.*, 2010; Tischner *et al.*, 2012). Estudos prévios têm apontado que subpopulações específicas de células T são apoptóticas em pacientes com LES (Wang *et al.*, 2005). Porém, dados conflitantes a respeito do papel das células Treg nesta doença são apresentados (Kuhn *et al.*, 2009; Venigalla *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2005).

As análises de imunofenotipagem revelaram um número aumentado de células CD4⁺CD127^{low}CD25^{high} no sangue periférico de mulheres com LES em relação às participantes controle, assim como uma maior densidade de expressão do marcador FoxP3 nestas células. FoxP3 caracteriza o subgrupo de células CD4⁺CD127^{low}CD25^{high} como Treg (**tabela 2, figura 1 – capítulo 5**). A frequência destas células no LES tem sido avaliada por diferentes grupos (Buckner, 2010; Gerli *et al.*, 2009; Venigalla *et al.*, 2008), sendo que a

maioria deles mostrou que a porcentagem de Treg nos pacientes com LES está diminuída, diferentemente dos nossos achados. Além disso, autores encontraram que o reduzido número e defeitos na supressão mediada por estas células correlacionavam-se com a atividade da doença (Alvarado-Sanchez *et al.*, 2006; Crispin *et al.*, 2003; Miyara *et al.*, 2005; Venigalla *et al.*, 2008). Um dos fatores ao qual esses defeitos podem ser atribuídos é o aumento da sensibilidade destas células à apoptose mediada pelo receptor Fas. De acordo com Miyara *et al.*, células Treg de pacientes com LES não são mortas por um fator circulante, mas demonstram uma sensibilidade aumentada à apoptose induzida pela molécula Fas. Esses autores relatam ainda que a depleção global de Treg correlaciona-se com a gravidade clínica e com crises da doença, sugerindo que a fisiopatologia do LES poderia estar ligada a um defeito no controle homeostático da subpopulação de Treg (Miyara *et al.*, 2005). Interessantemente, nosso estudo mostrou uma possível relação entre a frequência de células Treg e o SLEDAI. Observando os resultados, notamos que, conforme aumenta a severidade do LES, a frequência de células Treg também aumenta, porém sem diferença estatística (**tabela 3 – capítulo 5**). De maneira semelhante, Venigalla *et al.* relataram um aumento do número de células Treg em pacientes com LES ativo, embora a intensidade de expressão de FoxP3 nas células T CD4⁺CD25^{high} não tenha diferido entre pacientes com LES ativo e controles (Venigalla *et al.*, 2008).

Mais do que metade dos pacientes com LES envolvidos neste estudo estão em tratamento com imunossupressor. Desse modo, investigamos também a possível influência da terapia imunossupressora na frequência de células Treg. Os resultados mostraram um realçado, porém não significativo, aumento do número de Treg nos pacientes que estavam fazendo uso de drogas imunossupressoras no momento da coleta, comparados àqueles que não o faziam. Um aumento na frequência destas células em pacientes com LES seguindo tratamento com corticosteroides já foi relatado por outros grupos (Azab *et al.*, 2008; Suarez *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008a). Tem-se discutido que o uso de imunossupressor pode conduzir à expansão ou à geração de células Treg, através da superexpressão e modulação de receptor TNF induzido por glicocorticoide. Além disso, foi sugerido que o aumento na expressão de CD25 após a terapia cause um aumento na expressão de receptores de citocinas. Estudos mostram que corticosteroides suprimem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, enquanto induzem a expressão de TGF- β (Azab *et al.*, 2008). Há relatos de que o tratamento com dexametasona é capaz de ampliar a população de

células Treg e que a manutenção dos níveis de corticoide possibilita a ampliação deste grupo de células, efeito que pode ser observado *in vitro* e *in vivo* (Chen *et al.*, 2006a; Suarez *et al.*, 2006; Zhan *et al.*, 2004).

A apoptose é um processo altamente regulado e parece exercer grande importância na patogênese do LES, tendo o seu papel apoiado por estudos com modelos animais (Munoz *et al.*, 2008; Navratil & Ahearn, 2001). Diversos grupos têm relatado a alterada expressão de moléculas envolvidas na regulação apoptótica em diferentes subpopulações de linfócitos em pacientes com LES (Chen *et al.*, 2006b; Xue *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2015). Por esse motivo, investigamos alguns dos marcadores de apoptose presentes em células T que possam ser mais relevantes na patogênese do LES, envolvidos tanto na vias extrínseca quanto intrínseca de apoptose (Tischner *et al.*, 2012), tais como Fas, FasL, Bcl-2, Bax and p53.

Alguns estudos encontraram uma expressão aumentada de Fas em linfócitos T e B de pacientes com LES e revelaram uma positiva correlação com a atividade da doença (Bijl *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2006b; Liphaus *et al.*, 2006; Ohsako *et al.*, 1994; Xue *et al.*, 2006). Nossos resultados também revelaram uma maior frequência de linfócitos CD4⁺ expressando Fas em mulheres com LES (**tabela 2, figura 2 - capítulo 5**). Considerando que a expressão aumentada de Fas resulta em uma maior susceptibilidade à apoptose de células T, isso contribuiria para o aumento de material apoptótico, que conduziria à exacerbada resposta imunológica contra antígenos próprios nestes pacientes (Xue *et al.*, 2006). É descrito que interações entre Fas e FasL têm um profundo impacto na autotolerância e no desenvolvimento da autoimunidade, e que falhas na expressão destas moléculas estão associadas a autoanticorpos em camundongos e à progressão clínica acelerada em quase todas as linhagens murinas propensas ao LES (Bossaller *et al.*, 2013). Yang *et al.* também revelaram que a elevada expressão de Fas e FasL na superfície de células T contribui para uma maior taxa de apoptose destas células (Yang *et al.*, 2015). No entanto, no nosso estudo não foi possível observar qualquer associação entre a frequência de subpopulações de linfócitos T expressando o ligante de Fas (FasL) e o LES. A maior frequência do genótipo *FASL -844CC*, encontrada no nosso estudo inicial, não se correlacionou com um aumento na expressão da proteína nas células de pacientes com LES. Entretanto, é importante considerar que a possível associação encontrada entre a variante e a susceptibilidade à doença foi em uma população composta por pacientes

lúpicas afrodescendentes, enquanto que as análises imunofenotípicas envolveram um grupo de pacientes mulheres, constituído por 74% de eurodescendentes. Além disso, devemos ressaltar que FasL é expresso em células T ativadas e, neste trabalho, avaliamos células de pacientes *ex vivo*, sem estímulo. Outra possível explicação para o fato de não detectarmos uma maior expressão da proteína pode ter sido em razão do FasL de membrana sofrer clivagem por metaloproteinases, enzimas proteolíticas, dando origem ao sFasL, que não foi avaliado neste estudo (Gorak-Stolinska *et al.*, 2001; Lettau *et al.*, 2014). O sFasL pode ter origem tanto por *splicing* diferencial quanto por clivagem proteolítica. Por esses motivos, é possível que não tenhamos detectado a real expressão da molécula na superfície das células através desta abordagem (Janssen *et al.*, 2003; Linkermann *et al.*, 2003). Ainda, investigando uma possível relação entre os genótipos do polimorfismo *FASL* -844T/C e a expressão da proteína nos linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e Treg de mulheres lúpicas, não foi possível demonstrar que os diferentes genótipos influenciam a expressão de FasL nas células dos pacientes analisados. Wu *et al.*, observando o efeito do SNP -844 na atividade promotora de FasL, indicaram que doadores homocigotos -844C expressaram significativamente mais FasL em fibrócitos do que doadores homocigotos -844T, trazendo evidências de que o polimorfismo afeta a atividade promotora de *FasL* e altera a expressão basal da proteína (Wu *et al.*, 2003).

A via mitocondrial de apoptose é ativada extensivamente em resposta a sinais extracelulares e intracelulares, como dano ao DNA (Hengartner, 2000). Proteínas da família Bcl-2 estão envolvidas na seleção e maturação de células T no timo. Seu papel no sistema imune e sua frequente desregulação em patologias autoimunes têm sido propostos (Tischner *et al.*, 2012). Membros proapoptóticos e antiapoptóticos da família Bcl-2 encontram-se na superfície da mitocôndria, onde competem para regular a saída do citocromo c (Hengartner, 2000). A proteína antiapoptótica Bcl-2, por exemplo, atua impedindo a liberação do citocromo c e conduzindo a longevidade de células produtoras de anticorpos e permitindo que células autorreativas permaneçam na periferia. Tem-se sugerido, portanto, que alterações em Bcl-2 podem estar envolvidas na patogênese do LES (Strasser *et al.*, 1991a). Observamos uma regulação negativa da proteína antiapoptótica Bcl-2 em células T CD4⁺ e uma regulação positiva da proteína Bax em células T CD8⁺ de mulheres com LES (**tabela 2, figuras 3a e b – capítulo 5**). Esses resultados sugerem que células T de pacientes com LES são mais facilmente induzidas à morte por apoptose em

comparação às células de controles saudáveis. Sabe-se que alterações na via intrínseca de apoptose podem contribuir para a autoimunidade e que a maior expressão de Bcl-2 em camundongos prejudica a seleção negativa de timócitos e o desenvolvimento de células B expressando receptores de antígeno autorreativos. Porém, as informações existentes sobre como a regulação mediada pela expressão de Bcl-2 e Bax impacta na susceptibilidade das células à apoptose são escassas e fragmentadas (Tischner *et al.*, 2012). Contrariamente a estudos prévios, nosso trabalho não mostrou frequência aumentada de células T expressando Bcl-2 em pacientes com LES. No entanto, os estudos da literatura têm apresentado resultados contraditórios (Aringer *et al.*, 1994; Falcini *et al.*, 1999; Graninger *et al.*, 2000; Liphaut *et al.*, 2006; Ohsako *et al.*, 1994). Além disso, dados sugerem que a imunossupressão contribui, direta ou indiretamente, para a redução de Bcl-2, uma vez que a imunossupressão pode modificar a doença e modular a apoptose (Falcini *et al.*, 1999). Isso pode explicar, em parte, os resultados encontrados no nosso estudo, já que 60% dos pacientes usam drogas imunossupressoras. Esse efeito da imunossupressão também já foi demonstrado em estudos *in vitro*, utilizando linfócitos incubados com dexametasona e em linfócitos de pacientes adultos com LES (Mor & Cohen, 1996; Seki *et al.*, 1998). De acordo com Graninger *et al.*, nenhuma diferença foi observada com respeito à intensidade de sinal de Bax intracelular entre pacientes com LES e controles, contrariamente aos nossos achados. Os autores observaram que a adição de IL-2 em cultura de linfócitos realçou a expressão de Bcl-2 já elevada em pacientes com LES, mas os níveis de Bax não sofreram alteração após cultura *in vivo* com ou sem a adição de citocinas (Graninger *et al.*, 2000). Em 2012, um estudo conduzido com pacientes apresentando NL revelou uma maior expressão de Bax em tecidos destes indivíduos quando comparados a controles, sugerindo que a apoptose pode ser induzida através de vias reguladas por estas proteínas na patogênese do LES (Cui *et al.*, 2012). Além disso, observamos que pacientes com lúpus moderado (doença ativa) apresentaram uma menor frequência de células T CD4⁺ expressando Bcl-2 quando comparados a pacientes com doença inativa, seguindo a mesma linha de raciocínio dos nossos achados discutidos anteriormente, onde vimos uma regulação negativa de Bcl-2 no LES (**tabela 3, figura 3c - capítulo 5**). Diferentemente, Miret *et al.* observaram uma relação positiva entre Bcl-2 e a atividade da doença (Miret *et al.*, 2001), da mesma forma que Falcini *et al.*, os quais encontraram uma associação entre a expressão de Bcl-2 e o SLEDAI em pacientes com LES juvenil (Falcini *et al.*, 1999).

As análises de imunofenotipagem ainda mostraram uma frequência aumentada de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando p53 em pacientes com LES, quando comparados a controles (**tabela 2, figura 4a – capítulo 5**). Também foi possível observar uma maior frequência de células T CD8⁺ expressando p53 em pacientes lúpicos com positividade para anticorpos anti-DNA, se comparados aos pacientes que não apresentaram esses autoanticorpos (**figura 4b – capítulo 5**). Dessa forma, hipotetizamos que a expressão realçada de p53 induziria maior taxa de apoptose e, conseqüentemente, a liberação de material intracelular proveniente de células apoptóticas. Esse excesso de material apoptótico poderia estimular a produção de autoanticorpos nestes pacientes. Já foi relatado que o desenvolvimento de LES em humanos está correlacionado com aumentados níveis de p53 em linfócitos e defeitos na apoptose mediada por p53 (Miret *et al.*, 2003; Rathmell & Thompson, 2002). Miret *et al.* relataram que a p53 desempenha um papel não só na patogênese, mas também na atividade do LES. Neste estudo, uma significativa correlação foi encontrada entre os níveis de p53 em linfócitos e a presença de anticorpos anti-DNA, o que está de acordo com nossos achados (Miret *et al.*, 2003). Postula-se que a restauração seletiva da função de p53 em células T poderia ser aplicada ao tratamento de doenças autoimunes (Takatori *et al.*, 2014).

Além de proteínas reguladoras da apoptose, investigamos a frequência de apoptose inicial e morte celular em linfócitos de pacientes com LES. Em condições normais, a fosfatidilserina, um componente fosfolipídico, encontra-se no folheto interno da membrana plasmática da célula. No início da apoptose, ocorre a translocação da fosfatidilserina para o lado externo da membrana celular. Dessa forma, é possível detectar células em estágio inicial de apoptose utilizando a Anexina V, que possui alta afinidade pela fosfatidilserina. Já a morte celular pode ser detectada através do uso do intercalante fluorescente que se associa ao DNA da célula, o 7-Amino-Actinomicina-D (7-AAD), que normalmente não pode atravessar a membrana celular intacta. Nos estágios médio e tardio de apoptose, o 7-AAD consegue atravessar a membrana celular, devido à sua ruptura e corar o núcleo. Através destas análises, observamos que mulheres lúpicas apresentaram uma frequência aumentada de morte de linfócitos em relação a mulheres controle. No entanto, não é possível afirmar que estas células estavam em processo de apoptose tardio ou que sofreram necrose, um outro tipo de morte celular. Estes achados concordam com estudos prévios, demonstrando que a porcentagem de células mortas foi maior em pacientes com LES do

que em controles. Mas, em contraste, os autores encontraram um aumento na frequência de células em apoptose inicial em pacientes com doença ativa e inativa em relação aos controles (Xue *et al.*, 2006). Em outro trabalho, a porcentagem de células T em estágio inicial de apoptose também não diferiu da porcentagem observada no grupo controle (Rastin *et al.*, 2013).

Além destes, investigamos ainda marcadores apoptóticos em nível de expressão de RNAm, a fim de buscar uma possível relação com os achados de expressão em nível proteico. Nossos resultados mostraram uma regulação negativa do gene antiapoptótico *BCL-2* em células de pacientes com LES. Esse resultado dá suporte aos nossos achados em relação à expressão em nível proteico, os quais revelaram menor frequência de células T CD4⁺ expressando Bcl-2 nos pacientes. Recentemente, Rastin *et al.* observaram níveis de expressão do gene *FASL* significativamente mais baixos em mulheres lúpicas do que em controles, mas não observaram o mesmo quanto a expressão de *FAS* e *BCL-2* entre os grupos, contrariando o nosso achado.

De maneira geral, o presente estudo (artigo 2) revelou um aumento do número de células T expressando algumas proteínas que participam da regulação da apoptose, como Fas, Bax e p53 em pacientes com LES. Uma relação poderia ser encontrada entre estes achados e a expressão dos genes que codificam estas moléculas. Mas, essa relação foi percebida apenas quanto à expressão de Bcl-2. É importante salientar que, embora tenhamos encontrado a relação entre a expressão gênica e proteica de Bcl-2, a menor expressão da proteína foi encontrada em um grupo particular de células T (T CD4⁺), enquanto que a menor expressão do gene *BCL-2* foi observada a partir de PBMCs de pacientes com LES. A provável explicação para a não-concordância dos demais pode ser atribuída a muitos fatores incluindo, modificações pós-transcricionais, como splicing, além de defeitos no *clearance* de células apoptóticas, que poderiam resultar em um acúmulo de material apoptótico e não necessariamente a expressão elevada dos marcadores observada em nível proteico ser uma consequência da maior expressão do gene (Gaipl *et al.*, 2007; Rastin *et al.*, 2013). Além disso, vale ressaltar que a expressão de genes pode ser modulada pela terapia utilizada. Uma pesquisa interessante, avaliando a expressão gênica diferencial em larga escala de células T em pacientes com LES, estudados antes e depois do tratamento com imunossuppressores, relatou que o gene *TP53* estava entre os genes

reprimidos em pacientes não-tratados, ao passo que estava no grupo de genes induzidos durante o tratamento (Pereira *et al.*, 2004).

Inicialmente, a grande questão que motivou a execução do trabalho apresentado no artigo 2 era saber se o número/comportamento de células Treg em pacientes com LES poderia ser influenciado pelo nível de expressão de proteínas pro e antiapoptóticas, ou seja, se as células Treg sofriam uma maior ou menor apoptose e de que forma isso poderia impactar no desenvolvimento ou na clínica do LES, já que se trata de uma subpopulação celular crucial que exerce a supressão imunológica periférica (Miyara *et al.*, 2005). Embora nossos resultados tenham mostrado uma maior frequência de células Treg em mulheres lúpicas, não observamos diferenças quanto à frequência de células Treg expressando proteínas relacionadas à apoptose nestas pacientes, quando comparamos estes dados com os de mulheres controle, indicando modulação destas células possivelmente por outros fatores.

Em suma, a apoptose pode desempenhar um duplo papel na patofisiologia do LES, que deve ser interpretado dependendo do contexto da doença. Por um lado, o processo de apoptose pode ser benéfico, pois atua na eliminação de linfócitos autorreativos e, desse modo, age na manutenção da tolerância periférica. Assim, defeitos na indução de apoptose poderiam conduzir a persistência de células T e B autorreativas, que permanecem gerando resposta imunológica. Por outro lado, a apoptose realçada de células do sistema imune é considerada a principal fonte de autoantígenos, que estimula a produção de autoanticorpos pelas células B, com potencial para o desencadeamento de uma resposta autoimune, levando à formação de imunocomplexos e prejuízo para os tecidos (Su *et al.*, 2006). A apoptose e o *clearance* de células/materiais apoptóticos são processos chave na etiologia do LES e, dependendo do contexto, a fagocitose de células apoptóticas pode conduzir a uma resposta pró-inflamatória ou anti-inflamatória, que é decisiva no desenvolvimento de autoimunidade e pode sustentar condições inflamatórias (Munoz *et al.*, 2008).

Em conclusão, nosso trabalho sugere um importante papel das variantes polimórficas *FASL-844C* e *BAX -248A* no LES. Além disso, análises imunofenotípicas mostraram uma maior frequência de células T expressando proteínas pró-apoptóticas Fas, Bax e p53, e uma menor frequência de células expressando a molécula antiapoptótica Bcl-2, juntamente com a uma regulação negativa do gene *BCL-2* em mulheres com LES. Somados, estes resultados apontam para um mesmo desfecho: a maior susceptibilidade das

células T à apoptose nos pacientes lúpicos. Especula-se que a maior frequência de morte celular programada pode ser uma potente fonte de autoantígenos e, como consequência, teríamos a maior ativação de linfócitos T e B, induzindo a formação de autoanticorpos. Uma maior taxa de apoptose pode, além do mais, reduzir o número de células T CD4⁺ o que aumenta a susceptibilidade a infecções, que já são consideradas fatores de risco para o LES, contribuindo ainda mais para o seu desenvolvimento.

Considerações finais

Este é o primeiro estudo que engloba diferentes aspectos da regulação apoptótica, fornecendo uma visão mais ampla deste processo em pacientes com LES. As diferenças observadas neste trabalho com respeito ao repertório de proteínas pró- e antiapoptóticas sugerem defeitos nas vias de apoptose em pacientes com LES e podem estar refletindo uma menor capacidade de regulação do sistema imunológico na doença. No entanto, embora tenhamos encontrado importantes evidências da influência de alguns marcadores de apoptose no LES, devemos lembrar também da importância de se considerar, além do efeito de outros genes, a influência de citocinas, por exemplo, na expressão de moléculas envolvidas nas vias estudadas e na indução de apoptose. Além disso, os resultados encontrados quanto à influência dos polimorfismos no LES evidentemente mostram a diferença encontrada entre as etnias, apoiando a ideia de que devemos considerar a heterogeneidade genética das populações estudadas no momento de extrapolar os resultados para as demais populações. Estudos incluindo diferentes abordagens são necessários para confirmar nossos achados e elucidar os mecanismos moleculares e celulares que contribuem para a apoptose desregulada de células T em pacientes com LES. Os dados aqui apresentados reforçam o fato de que componentes genéticos e imunológicos reguladores da apoptose desempenham papel fundamental no controle da resposta imunológica, decisivo para a ocorrência de uma condição autoimune. Além do mais, a descoberta de alterações na expressão de genes/proteínas apoptóticas pode ser importante não somente para o conhecimento de causa, mas também por fornecer possibilidades de intervenções terapêuticas. O entendimento dos mecanismos envolvidos na regulação da apoptose poderá contribuir, futuramente, para o desenvolvimento de terapias apropriadas, mais direcionadas, que atuem restaurando a disfunção dessas moléculas como, por exemplo, uso de drogas com capacidade para bloquear receptores de morte celular ou

ativá-los, dependendo do contexto, medidas estas que poderiam mostrar-se mais efetivas do que a imunossupressão global dos pacientes com LES. A continuidade deste trabalho está prevista, uma vez que pretendemos ainda analisar o papel das citocinas séricas no plasma e em sobrenadante de células de pacientes com LES estimuladas em cultura, a fim de relacionar estes com os demais resultados já obtidos, assim como seguir avaliando outros marcadores de apoptose relevantes na doença (alguns destes dados já foram adquiridos).

REFERÊNCIAS

- (1999) The American College of Rheumatology nomenclature and case definitions for neuropsychiatric lupus syndromes. *Arthritis Rheum* 42:599-608.
- Achour A, Mankai A, Thabet Y, Sakly W, Braham F, Kechrid C, Bahri F, Bouajina E, Chouchene S, Haddad O *et al.* (2010) Systemic lupus erythematosus in the elderly. *Rheumatol Int.*
- Aggarwal S and Gupta S (1998) Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans: altered expression of Fas (CD95), Fas ligand, Bcl-2, and Bax. *J Immunol* 160:1627-1637.
- Ahmad YA and Bruce IN (2001) Genetic epidemiology: systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res* 3:331-336.
- Alarcon-Segovia D, Alarcon-Riquelme ME, Cardiel MH, Caeiro F, Massardo L, Villa AR, Pons-Estel BA and Grupo Latinoamericano de Estudio del Lupus E (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.
- Alvarado-Sanchez B, Hernandez-Castro B, Portales-Perez D, Baranda L, Layseca-Espinosa E, Abud-Mendoza C, Cubillas-Tejeda AC and Gonzalez-Amaro R (2006) Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 27:110-118.
- Andrade F, Casciola-Rosen L and Rosen A (2000) Apoptosis in systemic lupus erythematosus. Clinical implications. *Rheum Dis Clin North Am* 26:215-227, v.
- Aringer M, Wintersberger W, Steiner CW, Kiener H, Presterl E, Jaeger U, Smolen JS and Graninger WB (1994) High levels of bcl-2 protein in circulating T lymphocytes, but not B lymphocytes, of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 37:1423-1430.
- Aslanidis S, Pырpasopoulou A, Kontotasios K, Doumas S and Zamboulis C (2008) Parvovirus B19 infection and systemic lupus erythematosus: Activation of an aberrant pathway? *Eur J Intern Med* 19:314-318.
- Azab NA, Bassyouni IH, Emad Y, Abd El-Wahab GA, Hamdy G and Mashahit MA (2008) CD4+CD25+ regulatory T cells (TREG) in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: the possible influence of treatment with corticosteroids. *Clin Immunol* 127:151-157.
- Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, Dai M, Allan SE, Perroni L, Dagna-Bricarelli F, Sartirana C, Matthes-Martin S, Lawitschka A *et al.* (2006) Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest* 116:1713-1722.
- Bengtsson AA, Gullstrand B, Truedsson L and Sturfelt G (2008) SLE serum induces classical caspase-dependent apoptosis independent of death receptors. *Clin Immunol* 126:57-66.
- Bijl M, Horst G, Limburg PC and Kallenberg CG (2001) Fas expression on peripheral blood lymphocytes in systemic lupus erythematosus (SLE): relation to lymphocyte activation and disease activity. *Lupus* 10:866-872.
- Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL, de Teresa E, Farsang C, Gaw A, Gensini G, Leiter LA, Langer A, Martineau P, Hernandez G *et al.* (2007) Increased soluble Fas plasma levels in subjects at high cardiovascular risk: Atorvastatin on Inflammatory

- Markers (AIM) study, a substudy of ACTFAST. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:168-174.
- Boey ML (1998) Systemic lupus erythematosus in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 27:35-41.
- Bollain YGJJ, Arellano-Rodriguez M, Torres-Del-Muro Fde J, Daza-Benitez L, Munoz-Valle JF, Avalos-Diaz E and Herrera-Esparza R (2014) Soluble fas and the -670 polymorphism of fas in lupus nephritis. *Int J Nephrol* 2014:780406.
- Bonelli M, Savitskaya A, Steiner CW, Rath E, Smolen JS and Scheinecker C (2009) Phenotypic and functional analysis of CD4+ CD25- Foxp3+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 182:1689-1695.
- Borba EF, Latorre LC, Brenol JC, Kayser C, da Silva NA, Zimmermann AF, de Pádua PM, Costallat LT, Bonfá E and Sato EI (2008) Consensus of Systemic Lupus Erythematosus. *Rev Bras Reumatol* 48:196-207.
- Borchers AT, Keen CL, Shoenfeld Y and Gershwin ME (2004) Surviving the butterfly and the wolf: mortality trends in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 3:423-453.
- Borchers AT, Naguwa SM, Shoenfeld Y and Gershwin ME (2010) The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 9:A277-287.
- Borner C (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 39:615-647.
- Bossaller L, Rathinam VA, Bonegio R, Chiang PI, Busto P, Wespiser AR, Caffrey DR, Li QZ, Mohan C, Fitzgerald KA *et al.* (2013) Overexpression of membrane-bound fas ligand (CD95L) exacerbates autoimmune disease and renal pathology in pristane-induced lupus. *J Immunol* 191:2104-2114.
- Broen J, Gourh P, Rueda B, Coenen M, Mayes M, Martin J, Arnett FC and Radstake TR (2009) The FAS -670A>G polymorphism influences susceptibility to systemic sclerosis phenotypes. *Arthritis Rheum* 60:3815-3820.
- Brown JM, Archer AJ, Pfau JC and Holian A (2003) Silica accelerated systemic autoimmune disease in lupus-prone New Zealand mixed mice. *Clin Exp Immunol* 131:415-421.
- Brown R (1997) The bcl-2 family of proteins. *Br Med Bull* 53:466-477.
- Buckner JH (2010) Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 10:849-859.
- Cai XY, Luo M, Lin XJ, Xu YL, Tang C, Ye JH, Li WN, He ZX and Yu N (2012) [Expression and significance of Th17 and Treg cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 92:460-463.
- Casciola-Rosen LA, Anhalt G and Rosen A (1994) Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 179:1317-1330.
- Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Mejia JC, Aydintug AO, Chwalinska-Sadowska H, de Ramon E *et al.* (2003) Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore)* 82:299-308.
- Chan EY, Ko SC and Lau CS (1997) Increased rate of apoptosis and decreased expression of bcl-2 protein in peripheral blood lymphocytes from patients with active systemic lupus erythematosus. *Asian Pac J Allergy Immunol* 15:3-7.
- Chan KL and Mok CC (2013) Development of systemic lupus erythematosus in a male-to-female transsexual: the role of sex hormones revisited. *Lupus* 22:1399-1402.

- Chang C and Gershwin ME (2011) Drug-induced lupus erythematosus: incidence, management and prevention. *Drug Saf* 34:357-374.
- Chen JY, Wang CM, Ma CC, Chow YH and Luo SF (2005) The -844C/T polymorphism in the Fas ligand promoter associates with Taiwanese SLE. *Genes Immun* 6:123-128.
- Chen K, Hu Z, Wang LE, Sturgis EM, El-Naggar AK, Zhang W and Wei Q (2007) Single-nucleotide polymorphisms at the TP53-binding or responsive promoter regions of BAX and BCL2 genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 28:2008-2012.
- Chen X, Oppenheim JJ, Winkler-Pickett RT, Ortaldo JR and Howard OM (2006a) Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3(+)CD4(+)CD25(+) T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE. *Eur J Immunol* 36:2139-2149.
- Chen X, Wang LL, Cai B, Chen J and Feng WH (2006b) [Role of Fas-FasL and caspase-3 signal transduction pathway in promoting apoptosis of T lymphocyte subset in SLE patients]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 22:588-590.
- Chung SA and Criswell LA (2007) PTPN22: its role in SLE and autoimmunity. *Autoimmunity* 40:582-590.
- Cohen-Solal JF, Jeganathan V, Hill L, Kawabata D, Rodriguez-Pinto D, Grimaldi C and Diamond B (2008) Hormonal regulation of B-cell function and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 17:528-532.
- Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW and Gilkeson GS (2002a) Hormonal and reproductive risk factors for development of systemic lupus erythematosus: results of a population-based, case-control study. *Arthritis Rheum* 46:1830-1839.
- Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW and Gilkeson GS (2002b) Risk factors for development of systemic lupus erythematosus: allergies, infections, and family history. *J Clin Epidemiol* 55:982-989.
- Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Parks CG and Gilkeson GS (1998) Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41:1714-1724.
- Costantino CM, Baecher-Allan CM and Hafler DA (2008) Human regulatory T cells and autoimmunity. *Eur J Immunol* 38:921-924.
- 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, Martinez A and Alcocer-Varela J (2003) Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 21:273-276.
- Crispin JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, Kyttaris VC, Juang YT and Tsokos GC (2008) 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 and Tsokos GC (2009) Human TCR-alpha beta+ CD4- CD8- T cells can derive from CD8+ T cells and display an inflammatory effector phenotype. *J Immunol* 183:4675-4681.
- Crispin JC, Vargas MI and Alcocer-Varela J (2004) Immunoregulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 3:45-51.
- Criswell LA (2008) The genetic contribution to systemic lupus erythematosus. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 66:176-183.

- Cui JH, Qiao Q, Guo Y, Zhang YQ, Cheng H, He FR and Zhang J (2012) Increased apoptosis and expression of FasL, Bax and caspase-3 in human lupus nephritis class II and IV. *J Nephrol* 25:255-261.
- Cutolo M, Sulli A, Serio B, Accardo S and Masi AT (1995) Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol* 13:217-226.
- 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.
- Deng Y and Tsao BP (2010) Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol* 6:683-692.
- Desbarats J, Duke RC and Newell MK (1998) Newly discovered role for Fas ligand in the cell-cycle arrest of CD4+ T cells. *Nat Med* 4:1377-1382.
- 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.
- Dommett RM, Klein N and Turner MW (2006) Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* 68:193-209.
- Doria A, Cutolo M, Ghirardello A, Zampieri S, Vescovi F, Sulli A, Giusti M, Piccoli A, Grella P and Gambari PF (2002) Steroid hormones and disease activity during pregnancy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 47:202-209.
- Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC, 3rd, George DL and Murphy M (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33:357-365.
- Edworthy SM, Zatarain E, McShane DJ and Bloch DA (1988) Analysis of the 1982 ARA lupus criteria data set by recursive partitioning methodology: new insights into the relative merit of individual criteria. *J Rheumatol* 15:1493-1498.
- Eguchi K (2001) Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med* 40:275-284.
- El-Garf A, Salah S, Shaarawy M, Zaki S and Anwer S (1996) Prolactin hormone in juvenile systemic lupus erythematosus: a possible relationship to disease activity and CNS manifestations. *J Rheumatol* 23:374-377.
- Eliopoulos E, Zervou M, Andreou A, Dimopoulou K, Cosmidis N, Voloudakis G, Mysirlaki H, Vazgiourakis V, Sidiropoulos P, Niewold T *et al.* (2011) Association of the PTPN22 R620W polymorphism with increased risk for SLE in the genetically homogeneous population of Crete. *Lupus* 20:501-506.
- Falcini F, Azzari C, Gelli VA, Luchetti M, Gabrielli A, Calzolari A, Pignone A, Generini S and Matucci Cerinic M (1999) Reduction of bcl-2 in T cells during immunosuppressive therapy in patients with severe juvenile onset systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 93:59-64.
- Fegan C, Starczynski J, Pratt G and Pepper C (2006) The role of the bax gene polymorphism G(-248)A in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 20:1460-1461.
- Feng Y (1997) [Studies on Fas ligand expression in patients with systemic lupus erythematosus]. *Hokkaido Igaku Zasshi* 72:443-455.
- Finckh A, Cooper GS, Chibnik LB, Costenbader KH, Watts J, Pankey H, Fraser PA and Karlson EW (2006) Occupational silica and solvent exposures and risk of systemic lupus erythematosus in urban women. *Arthritis Rheum* 54:3648-3654.
- Fraser PA, Ding WZ, Mohseni M, Treadwell EL, Dooley MA, St Clair EW, Gilkeson GS and Cooper GS (2003) Glutathione S-transferase M null homozygosity and risk of

- systemic lupus erythematosus associated with sun exposure: a possible gene-environment interaction for autoimmunity. *J Rheumatol* 30:276-282.
- Fredi M, Bianchi M, Andreoli L, Greco G, Olivieri I, Orcesi S, Fazzi E, Cereda C and Tincani A (2015) Typing TREX1 gene in patients with systemic lupus erythematosus. *Reumatismo* 67:1-7.
- Fritzsching B, Oberle N, Eberhardt N, Quick S, Haas J, Wildemann B, Krammer PH and Suri-Payer E (2005) In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J Immunol* 175:32-36.
- Furukawa F, Itoh T, Wakita H, Yagi H, Tokura Y, Norris DA and Takigawa M (1999) Keratinocytes from patients with lupus erythematosus show enhanced cytotoxicity to ultraviolet radiation and to antibody-mediated cytotoxicity. *Clin Exp Immunol* 118:164-170.
- Gaipl US, Munoz LE, Grossmayer G, Lauber K, Franz S, Sarter K, Voll RE, Winkler T, Kuhn A, Kalden J *et al.* (2007) Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J Autoimmun* 28:114-121.
- Garrett-Sinha LA, John S and Gaffen SL (2008) IL-17 and the Th17 lineage in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 20:519-525.
- Gavin MA, Clarke SR, Negrou E, Gallegos A and Rudensky A (2002) Homeostasis and energy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3:33-41.
- Gerli R, Nocentini G, Alunno A, Bocci EB, Bianchini R, Bistoni O and Riccardi C (2009) Identification of regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 8:426-430.
- Ghodke-Puranik Y and Niewold TB (2015) Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun*.
- Glesse N, Monticielo OA, Mattevi VS, Brenol JCT, Xavier RM, da Silva GK, dos Santos BP, Rucatti GG and Chies JAB (2011) Association of the mannose-binding lectin 2 gene polymorphic variants with susceptibility and clinical progression in systemic lupus erythematosus.
- Glesse N, Rohr P, Monticielo OA, Rech TF, Brenol JC, Xavier RM, Kvitko K and Chies JA (2014) Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases and cytochrome P450 enzymes as susceptibility factors to systemic lupus erythematosus in southern Brazilian patients. *Mol Biol Rep* 41:6167-6179.
- Gompel A and Piette JC (2007) Systemic lupus erythematosus and hormone replacement therapy. *Menopause Int* 13:65-70.
- Gorak-Stolinska P, Truman JP, Kemeny DM and Noble A (2001) Activation-induced cell death of human T-cell subsets is mediated by Fas and granzyme B but is independent of TNF-alpha. *J Leukoc Biol* 70:756-766.
- Graham RR, Kozyrev SV, Baechler EC, Reddy MV, Plenge RM, Bauer JW, Ortmann WA, Koeuth T, Gonzalez Escribano MF, Argentine *et al.* (2006) A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 38:550-555.
- Graham RR, Ortmann W, Rodine P, Espe K, Langefeld C, Lange E, Williams A, Beck S, Kyogoku C, Moser K *et al.* (2007) Specific combinations of HLA-DR2 and DR3 class II haplotypes contribute graded risk for disease susceptibility and autoantibodies in human SLE. *Eur J Hum Genet* 15:823-830.

- Granados J, Zuniga J, Acuna-Alonzo V, Rosetti F and Vargas-Alarcon G (2006) [Influence of alleles and haplotypes of the main histocompatibility complex on the susceptibility to systemic lupus erythematosus in the Mexican population]. *Gac Med Mex* 142:195-199.
- Graninger WB, Steiner CW, Graninger MT, Aringer M and Smolen JS (2000) Cytokine regulation of apoptosis and Bcl-2 expression in lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Cell Death Differ* 7:966-972.
- Green DR (2003) Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. *Immunol Rev* 193:5-9.
- Grochola LF, Zeron-Medina J, Meriaux S and Bond GL (2010) Single-nucleotide polymorphisms in the p53 signaling pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001032.
- Grygiel-Gorniak B and Puszczewicz MJ (2014) The influence of endogenous and exogenous sex hormones on systemic lupus erythematosus in pre- and postmenopausal women. *Prz Menopauzalny* 13:262-266.
- Han JW, Zheng HF, Cui Y, Sun LD, Ye DQ, Hu Z, Xu JH, Cai ZM, Huang W, Zhao GP *et al.* (2009) Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 41:1234-1237.
- Hay EM (1995) Systemic lupus erythematosus. *Baillieres Clin Rheumatol* 9:437-470.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.
- Hochberg MC (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40:1725.
- Horiuchi T, Washio M, Kiyohara C, Tsukamoto H, Tada Y, Asami T, Ide S, Kobashi G and Takahashi H (2009) Combination of TNF-RII, CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and the risk of Japanese SLE: findings from the KYSS study. *Rheumatology (Oxford)* 48:1045-1049.
- Horwitz DA (2010) Identity of mysterious CD4+CD25-Foxp3+ cells in SLE. *Arthritis Res Ther* 12:101.
- Huan J, Culbertson N, Spencer L, Bartholomew R, Burrows GG, Chou YK, Bourdette D, Ziegler SF, Offner H and Vandenberg AA (2005) Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res* 81:45-52.
- Huang QR, Danis V, Lassere M, Edmonds J and Manolios N (1999) Evaluation of a new Apo-1/Fas promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford)* 38:645-651.
- Huang QR and Manolios N (2000) Investigation of the -1377 polymorphism on the Apo-1/Fas promoter in systemic lupus erythematosus patients using allele-specific amplification. *Pathology* 32:126-130.
- Huang YF, Wang W, Han JY, Wu XW, Zhang ST, Liu CJ, Hu QG, Xiong P, Hamvas RM, Wood N *et al.* (2003) Increased frequency of the mannose-binding lectin LX haplotype in Chinese systemic lupus erythematosus patients. *Eur J Immunogenet* 30:121-124.
- International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus G, Harley JB, Alarcon-Riquelme ME, Criswell LA, Jacob CO, Kimberly RP, Moser KL, Tsao BP, Vyse TJ, Langefeld CD *et al.* (2008) Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet* 40:204-210.

- Jakab L, Laki J, Sallai K, Temesszentandrasi G, Pozsonyi T, Kalabay L, Varga L, Gombos T, Blasko B, Biro A *et al.* (2007) Association between early onset and organ manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE) and a down-regulating promoter polymorphism in the MBL2 gene. *Clin Immunol* 125:230-236.
- James JA, Kaufman KM, Farris AD, Taylor-Albert E, Lehman TJ and Harley JB (1997) An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 100:3019-3026.
- Janssen O, Qian J, Linkermann A and Kabelitz D (2003) CD95 ligand--death factor and costimulatory molecule? *Cell Death Differ* 10:1215-1225.
- Jeon JY, Kim KY, Kim BS, Jung JY, Kim HA and Suh CH (2015) FcγRIIB Gene Polymorphisms Are Associated with Disease Risk and Clinical Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus in Koreans. *Tohoku J Exp Med* 236:185-191.
- Jimenez S, Cervera R, Font J and Ingelmo M (2003) The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Clin Rev Allergy Immunol* 25:3-12.
- Johnson AE, Gordon C, Palmer RG and Bacon PA (1995) The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum* 38:551-558.
- Jonsen A, Bengtsson AA, Sturfelt G and Truedsson L (2004) Analysis of HLA DR, HLA DQ, C4A, FcγRIIa, FcγRIIIa, MBL, and IL-1Ra allelic variants in Caucasian systemic lupus erythematosus patients suggests an effect of the combined FcγRIIIa R/R and IL-1Ra 2/2 genotypes on disease susceptibility. *Arthritis Res Ther* 6:R557-562.
- Kaplan MJ (2004) Apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 112:210-218.
- Kaufman KM, Kelly JA, Herring BJ, Adler AJ, Glenn SB, Namjou B, Frank SG, Dawson SL, Bruner GR, James JA *et al.* (2006) Evaluation of the genetic association of the PTPN22 R620W polymorphism in familial and sporadic systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54:2533-2540.
- Kohler KF and Petzl-Erler ML (2006) No evidence for association of the TP53 12139 and the BAX-248 polymorphisms with endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). *Int J Immunogenet* 33:141-144.
- Kojima T, Horiuchi T, Nishizaka H, Sawabe T, Higuchi M, Harashima SI, Yoshizawa S, Tsukamoto H, Nagasawa K and Niho Y (2000) Analysis of fas ligand gene mutation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 43:135-139.
- Koller M, Zwolfer B, Steiner G, Smolen JS and Scheinecker C (2004) Phenotypic and functional deficiencies of monocyte-derived dendritic cells in systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *Int Immunol* 16:1595-1604.
- Komaki S, Kohno M, Matsuura N, Shimadzu M, Adachi N, Hoshida R, Nishiyama S and Matsuda I (1998) The polymorphic 43Thr bcl-2 protein confers relative resistance to autoimmunity: an analytical evaluation. *Hum Genet* 103:435-440.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M and Kuchroo VK (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27:485-517.
- Kretz-Rommel A and Rubin RL (2000) Disruption of positive selection of thymocytes causes autoimmunity. *Nat Med* 6:298-305.
- Kuhn A, Beissert S and Krammer PH (2009) CD4(+)CD25 (+) regulatory T cells in human lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res* 301:71-81.

- Kyttaris VC, Krishnan S and Tsokos GC (2006) Systems biology in systemic lupus erythematosus: integrating genes, biology and immune function. *Autoimmunity* 39:705-709.
- Lahita RG (1990) Sex hormones and the immune system--Part 1. Human data. *Baillieres Clin Rheumatol* 4:1-12.
- Lahita RG (1999) The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 11:352-356.
- Lee YH, Bae SC, Choi SJ, Ji JD and Song GG (2012) Genome-wide pathway analysis of genome-wide association studies on systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Mol Biol Rep* 39:10627-10635.
- Lee YH, Kim YR, Ji JD, Sohn J and Song GG (2001a) Fas promoter -670 polymorphism is associated with development of anti-RNP antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 28:2008-2011.
- Lee YH, Kim YR, Ji JD, Sohn J and Song GG (2001b) p53 codon 72 polymorphism and rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28:2392-2394.
- Lee YH, Rho YH, Choi SJ, Ji JD and Song GG (2005) The functional p53 codon 72 polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 14:842-845.
- Lehmann P, Holzle E, Kind P, Goerz G and Plewig G (1990) Experimental reproduction of skin lesions in lupus erythematosus by UVA and UVB radiation. *J Am Acad Dermatol* 22:181-187.
- Lettau M, Voss M, Ebsen H, Kabelitz D and Janssen O (2014) Differential protein-protein interactions of full length human FasL and FasL fragments generated by proteolysis. *Exp Cell Res* 320:290-301.
- Levings MK, Allan S, d'Hennezel E and Piccirillo CA (2006) Functional dynamics of naturally occurring regulatory T cells in health and autoimmunity. *Adv Immunol* 92:119-155.
- Lewis MJ, Vyse S, Shields AM, Boeltz S, Gordon PA, Spector TD, Lehner PJ, Walczak H and Vyse TJ (2015) UBE2L3 polymorphism amplifies NF-kappaB activation and promotes plasma cell development, linking linear ubiquitination to multiple autoimmune diseases. *Am J Hum Genet* 96:221-234.
- Lim SS and Drenkard C (2015) Epidemiology of lupus: an update. *Curr Opin Rheumatol* 27:427-432.
- Linkermann A, Qian J and Janssen O (2003) Slowly getting a clue on CD95 ligand biology. *Biochem Pharmacol* 66:1417-1426.
- Liphaus BdL, 2005 Expressão das proteínas Fas e Bcl-2 em células mononucleares de crianças e adolescentes com lúpus eritematoso sistêmico, pp. 149 in *Departamento de Pediatria*. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Liphaus BL and Kiss MH (2010) The role of apoptosis proteins and complement components in the etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clinics (Sao Paulo)* 65:327-333.
- Liphaus BL, Kiss MH, Carrasco S and Goldenstein-Schainberg C (2006) Increased Fas and Bcl-2 expression on peripheral blood T and B lymphocytes from juvenile-onset systemic lupus erythematosus, but not from juvenile rheumatoid arthritis and juvenile dermatomyositis. *Clin Dev Immunol* 13:283-287.
- Liu MF, Wang CR, Fung LL and Wu CR (2004) Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 59:198-202.
- Manson JJ and Rahman A (2006) Systemic lupus erythematosus. *Orphanet J Rare Dis* 1:6.

- Manzi S (2001) Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Am J Manag Care* 7:S474-479.
- Manzi S (2009) Lupus update: perspective and clinical pearls. *Cleve Clin J Med* 76:137-142.
- Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD, Levine SS, Fraenkel E, von Boehmer H and Young RA (2007) Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature* 445:931-935.
- McBride OW, Merry D and Givol D (1986) The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:130-134.
- 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.
- McMurray RW (2001) Sex hormones in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Front Biosci* 6:E193-206.
- McMurray RW and May W (2003) Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis Rheum* 48:2100-2110.
- Miret C, Font J, Molina R, Garcia-Carrasco M, Filella X, Ramos M, Cervera R, Ballesta A and Ingelmo M (2001) Relationship of oncogenes (sFas, Bcl-2) and cytokines (IL-10, alfa-TNF) with the activity of systemic lupus erythematosus. *Anticancer Res* 21:3053-3059.
- Miret C, Molina R, Filella X, Garcia-Carrasco M, Claver G, Ingelmo M, Ballesta A and Font J (2003) Relationship of p53 with other oncogenes, cytokines and systemic lupus erythematosus activity. *Tumour Biol* 24:185-188.
- Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, Nochy D, Debre P, Piette JC and Gorochov G (2005) Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 175:8392-8400.
- Miyashita T and Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293-299.
- Mohammadzadeh A, Pourfathollah AA, Sahraian MA, Behmanesh M, Daneshmandi S, Moeinfar Z and Heidari M (2012) Evaluation of apoptosis-related genes: Fas (CD94), FasL (CD178) and TRAIL polymorphisms in Iranian multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 312:166-169.
- Mohammadzadeh A, Pourfathollah AA, Tahoori MT, Daneshmandi S, Langroudi L and Akhlaghi M (2011) Evaluation of apoptosis-related gene Fas (CD95) and FasL (CD178) polymorphisms in Iranian rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int*.
- Molokhia M and McKeigue P (2006) Systemic lupus erythematosus: genes versus environment in high risk populations. *Lupus* 15:827-832.
- Monticielo OA, Chies JA, Mucenic T, Rucatti GG, Junior JM, da Silva GK, Glesse N, dos Santos BP, Brenol JC and Xavier RM (2010) Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 19:280-287.
- Monticielo OA, Mucenic T, Xavier RM, Brenol JC and Chies JA (2008) The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 27:413-419.
- Mor F and Cohen IR (1996) IL-2 rescues antigen-specific T cells from radiation or dexamethasone-induced apoptosis. Correlation with induction of Bcl-2. *J Immunol* 156:515-522.

- Moss KE, Ioannou Y, Sultan SM, Haq I and Isenberg DA (2002) Outcome of a cohort of 300 patients with systemic lupus erythematosus attending a dedicated clinic for over two decades. *Ann Rheum Dis* 61:409-413.
- Moudi B, Salimi S, Farajian Mashhadi F, Sandoughi M and Zakeri Z (2013) Association of FAS and FAS ligand genes polymorphism and risk of systemic lupus erythematosus. *ScientificWorldJournal* 2013:176741.
- Movassagh M and Foo RS (2008) Simplified apoptotic cascades. *Heart Fail Rev* 13:111-119.
- Munoz LE, van Bavel C, Franz S, Berden J, Herrmann M and van der Vlag J (2008) Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 17:371-375.
- Nagata S and Suda T (1995) Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol Today* 16:39-43.
- Nath SK, Han S, Kim-Howard X, Kelly JA, Viswanathan P, Gilkeson GS, Chen W, Zhu C, McEver RP, Kimberly RP *et al.* (2008) A nonsynonymous functional variant in integrin- α (M) (encoded by ITGAM) is associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 40:152-154.
- Navratil JS and Ahearn JM (2001) Apoptosis, clearance mechanisms, and the development of systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 3:191-198.
- Niewold TB (2015) Advances in lupus genetics. *Curr Opin Rheumatol* 27:440-447.
- Niewold TB, Kelly JA, Kariuki SN, Franek BS, Kumar AA, Kaufman KM, Thomas K, Walker D, Kamp S, Frost JM *et al.* (2012) IRF5 haplotypes demonstrate diverse serological associations which predict serum interferon alpha activity and explain the majority of the genetic association with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 71:463-468.
- Nolsoe RL, Kelly JA, Pociot F, Moser KL, Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T and Harley JB (2005) Functional promoter haplotypes of the human FAS gene are associated with the phenotype of SLE characterized by thrombocytopenia. *Genes Immun* 6:699-706.
- Nuckel H, Frey UH, Bau M, Sellmann L, Stanelle J, Durig J, Jockel KH, Duhresen U and Siffert W (2007) Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 109:290-297.
- Ocana MG, Valle-Garay E, Montes AH, Meana A, Carton JA, Fierer J, Celada A and Asensi V (2007) Bax gene G(-248)A promoter polymorphism is associated with increased lifespan of the neutrophils of patients with osteomyelitis. *Genet Med* 9:249-255.
- Ohl K and Tenbrock K (2015) Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Eur J Immunol* 45:344-355.
- Ohsako S, Hara M, Harigai M, Fukasawa C and Kashiwazaki S (1994) Expression and function of Fas antigen and bcl-2 in human systemic lupus erythematosus lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol* 73:109-114.
- Onel KB, Huo D, Hastings D, Fryer-Biggs J, Crow MK and Onel K (2009) Lack of association of the TP53 Arg72Pro SNP and the MDM2 SNP309 with systemic lupus erythematosus in Caucasian, African American, and Asian children and adults. *Lupus* 18:61-66.
- Parks CG and Cooper GS (2005) Occupational exposures and risk of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 38:497-506.

- Pereira E, Tamia-Ferreira MC, Cardoso RS, Mello SS, Sakamoto-Hojo ET, Passos GA and Donadi EA (2004) Immunosuppressive therapy modulates T lymphocyte gene expression in patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology* 113:99-105.
- Petri M, Orbai AM, Alarcon GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, Bruce IN, Isenberg D, Wallace DJ, Nived O *et al.* (2012) Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 64:2677-2686.
- Piotrowski P, Lianeri M, Mostowska M, Wudarski M, Chwalinska-Sadowska H and Jagodzinski PP (2008) Contribution of polymorphism in codon 72 of p53 gene to systemic lupus erythematosus in Poland. *Lupus* 17:148-151.
- Pons-Estel GJ, Alarcon GS, Scofield L, Reinlib L and Cooper GS (2010) Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 39:257-268.
- Pugh-Bernard AE and Cambier JC (2006) B cell receptor signaling in human systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 18:451-455.
- Rahman A and Isenberg DA (2008) Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 358:929-939.
- Ramos-Casals M, Cuadrado MJ, Alba P, Sanna G, Brito-Zeron P, Bertolaccini L, Babini A, Moreno A, D'Cruz D and Khamashta MA (2008) Acute viral infections in patients with systemic lupus erythematosus: description of 23 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 87:311-318.
- Rastin M, Mahmoudi M, Hatef M, Sahebari M, Tabasi N, Haghmorad D, Nosratabadi R, Zamani S, Khazaei M and Masoudian M (2013) T lymphocyte apoptosis in systemic lupus erythematosus patients. *Iran J Basic Med Sci* 16:936-941.
- Rathmell JC and Thompson CB (2002) Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 109 Suppl:S97-107.
- Ren Y, Tang J, Mok MY, Chan AW, Wu A and Lau CS (2003) Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 48:2888-2897.
- 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.
- Rood MJ, van Krugten MV, Zanelli E, van der Linden MW, Keijsers V, Schreuder GM, Verduyn W, Westendorp RG, de Vries RR, Breedveld FC *et al.* (2000) TNF-308A and HLA-DR3 alleles contribute independently to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 43:129-134.
- Rosenmann H, Meiner Z, Kahana E, Aladjem Z, Friedman G, Ben-Yehuda A, Grenader T, Wertman E and Abramsky O (2003) An association study of the codon 72 polymorphism in the pro-apoptotic gene p53 and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 340:29-32.
- Saenz-Corral CI, Vega-Memije ME, Martinez-Luna E, Cuevas-Gonzalez JC, Rodriguez-Carreón AA, de la Rosa JJ, Del Muro Fde J and Avalos-Diaz E (2015) Apoptosis in chronic cutaneous lupus erythematosus, discoid lupus, and lupus profundus. *Int J Clin Exp Pathol* 8:7260-7265.
- Saevarsdottir S, Kristjansdottir H, Grondal G, Vikingsdottir T, Steinsson K and Valdimarsson H (2006) Mannan-binding lectin and complement C4A in Icelandic

- multicase families with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 65:1462-1467.
- Sahebari M, Hatef MR, Rezaieyazdi Z, Abbasi M, Abbasi B and Mahmoudi M (2010) Correlation between serum levels of soluble Fas (CD95/Apo-1) with disease activity in systemic lupus erythematosus patients in Khorasan, Iran. *Arch Iran Med* 13:135-142.
- Sakaguchi S, Wing K and Miyara M (2007) Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol* 37 Suppl 1:S116-123.
- Sakurai D, Zhao J, Deng Y, Kelly JA, Brown EE, Harley JB, Bae SC, Alarcomicronn-Riquelme ME, Biolupus, networks G *et al.* (2013) Preferential binding to Elk-1 by SLE-associated IL10 risk allele upregulates IL10 expression. *PLoS Genet* 9:e1003870.
- Salimi S, Nakhaee A, Jafari M, Jahantigh D, Sandooghi M, Zakeri Z, Shahrakipour M, Naghavi A and Farajian-Mashhadi F (2015) Combination Effect of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 Polymorphisms and Risk of Systemic Lupus Erythematosus. *Iran J Public Health* 44:814-821.
- Salmon M and Gordon C (1999) The role of apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 38:1177-1183.
- Sanchez E, Comeau ME, Freedman BI, Kelly JA, Kaufman KM, Langefeld CD, Brown EE, Alarcon GS, Kimberly RP, Edberg JC *et al.* (2011) Identification of novel genetic susceptibility loci in African American lupus patients in a candidate gene association study. *Arthritis Rheum* 63:3493-3501.
- Sanchez E, Sabio JM, Callejas JL, de Ramon E, de Haro M, Jimenez-Alonso J, Ortego-Centeno N, Sanchez-Roman J, Gonzalez-Gay MA, Lopez-Nevot MA *et al.* (2006) Study of a functional polymorphism in the p53 gene in systemic lupus erythematosus: lack of replication in a Spanish population. *Lupus* 15:658-661.
- Sandrin-Garcia P, Brandao LA, Coelho AV, Guimaraes RL, Pancoto JA, Segat L, Donadi EA, de Lima-Filho JL and Crovella S (2011) Mannose binding lectin gene (MBL2) functional polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in southern Brazilians. *Hum Immunol* 72:516-521.
- Saxena A, Moshynska O, Sankaran K, Viswanathan S and Sheridan DP (2002) Association of a novel single nucleotide polymorphism, G(-248)A, in the 5'-UTR of BAX gene in chronic lymphocytic leukemia with disease progression and treatment resistance. *Cancer Lett* 187:199-205.
- Seki M, Ushiyama C, Seta N, Abe K, Fukazawa T, Asakawa J, Takasaki Y and Hashimoto H (1998) Apoptosis of lymphocytes induced by glucocorticoids and relationship to therapeutic efficacy in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41:823-830.
- Shenghui Z, Yixiang H, Jianbo W, Kang Y, Laixi B, Yan Z and Xi X (2010) Elevated frequencies of CD4(+) CD25(+) CD127lo regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Int J Cancer* 129:1373-1381.
- Singh N, Yamamoto M, Takami M, Seki Y, Takezaki M, Mellor AL and Iwashima M (2010) CD4(+)CD25(+) regulatory T cells resist a novel form of CD28- and Fas-dependent p53-induced T cell apoptosis. *J Immunol* 184:94-104.
- Smith-Bouvier DL, Divekar AA, Sasidhar M, Du S, Tiwari-Woodruff SK, King JK, Arnold AP, Singh RR and Voskuhl RR (2008) A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. *J Exp Med* 205:1099-1108.

- Starczynski J, Pepper C, Pratt G, Hooper L, Thomas A, Milligan D, Bentley P and Fegan C (2005) Common polymorphism G(-248)A in the promoter region of the bax gene results in significantly shorter survival in patients with chronic lymphocytic Leukemia once treatment is initiated. *J Clin Oncol* 23:1514-1521.
- Stohl W (1995) Impaired polyclonal T cell cytolytic activity. A possible risk factor for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 38:506-516.
- Strasser A, Harris AW and Cory S (1991a) bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell* 67:889-899.
- Strasser A, Whittingham S, Vaux DL, Bath ML, Adams JM, Cory S and Harris AW (1991b) Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8661-8665.
- Stuck BJ, Pani MA, Besrouf F, Segni M, Krause M, Usadel KH and Badenhop K (2003) Fas ligand gene polymorphisms are not associated with Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. *Hum Immunol* 64:285-289.
- Su DL, Wang HJ, Ji XH, Li YY, Xuan HB, Heng C and Li YF (2006) Mycophenolic acid inhibits SLE-associated cytokine expression and promotes apoptosis of peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Acta Pharmacol Sin* 27:1051-1057.
- Suarez A, Lopez P, Gomez J and Gutierrez C (2006) Enrichment of CD4+ CD25high T cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. *Ann Rheum Dis* 65:1512-1517.
- Sullivan KE (2000) Genetics of systemic lupus erythematosus. Clinical implications. *Rheum Dis Clin North Am* 26:229-256, v-vi.
- Szodoray P, Jellestad S, Nakken B, Brun JG and Jonsson R (2003) Programmed cell death in rheumatoid arthritis peripheral blood T-cell subpopulations determined by laser scanning cytometry. *Lab Invest* 83:1839-1848.
- Takatori H, Kawashima H, Suzuki K and Nakajima H (2014) Role of p53 in systemic autoimmune diseases. *Crit Rev Immunol* 34:509-516.
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N and Winchester RJ (1982) The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271-1277.
- Tang L, Wan P, Wang Y, Pan J, Wang Y and Chen B (2015) Genetic association and interaction between the IRF5 and TYK2 genes and systemic lupus erythematosus in the Han Chinese population. *Inflamm Res*.
- Taubert H, Thamm B, Meye A, Bartel F, Rost AK, Heidenreich D, John V, Brandt J, Bache M, Wurl P *et al.* (2000) The p53 status in juvenile chronic arthritis and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 122:264-269.
- Tebbe B and Orfanos CE (1997) Epidemiology and socioeconomic impact of skin disease in lupus erythematosus. *Lupus* 6:96-104.
- Tikly M and Navarra SV (2008) Lupus in the developing world--is it any different? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22:643-655.
- Tischner D, Gaggl I, Peschel I, Kaufmann M, Tuzlak S, Drach M, Thuille N, Villunger A and Jan Wieggers G (2012) Defective cell death signalling along the Bcl-2 regulated apoptosis pathway compromises Treg cell development and limits their functionality in mice. *J Autoimmun* 38:59-69.

- Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM and Krammer PH (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245:301-305.
- Truedsson L, Bengtsson AA and Sturfelt G (2007) Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 40:560-566.
- Tsokos GC, Wong HK, Enyedy EJ and Nambiar MP (2000) Immune cell signaling in lupus. *Curr Opin Rheumatol* 12:355-363.
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E and Croce CM (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228:1440-1443.
- Tucker LB (2007) Making the diagnosis of systemic lupus erythematosus in children and adolescents. *Lupus* 16:546-549.
- Vang T, Congia M, Macis MD, Musumeci L, Orru V, Zavattari P, Nika K, Tautz L, Tasken K, Cucca F *et al.* (2005) Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. *Nat Genet* 37:1317-1319.
- Varadhachary AS and Salgame P (1998) CD95 mediated T cell apoptosis and its relevance to immune deviation. *Oncogene* 17:3271-3276.
- Venigalla RK, Tretter T, Krienke S, Max R, Eckstein V, Blank N, Fiehn C, Ho AD and Lorenz HM (2008) Reduced CD4+,CD25- T cell sensitivity to the suppressive function of CD4+,CD25high,CD127 -/low regulatory T cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 58:2120-2130.
- Vignali DA, Collison LW and Workman CJ (2008) How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8:523-532.
- Vigouroux S, Yvon E, Biagi E and Brenner MK (2004) Antigen-induced regulatory T cells. *Blood* 104:26-33.
- Vilar MJ and Sato EI (2002) Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus* 11:528-532.
- Wang H, Xu J, Ji X, Yang X, Sun K, Liu X and Shen Y (2005) The abnormal apoptosis of T cell subsets and possible involvement of IL-10 in systemic lupus erythematosus. *Cell Immunol* 235:117-121.
- Wang M, Wu D, Tan M, Gong W, Xue H, Shen H and Zhang Z (2009) FAS and FAS ligand polymorphisms in the promoter regions and risk of gastric cancer in Southern China. *Biochem Genet* 47:559-568.
- Ward MM (1999) Premature morbidity from cardiovascular and cerebrovascular diseases in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 42:338-346.
- Ward MM (2004) Prevalence of physician-diagnosed systemic lupus erythematosus in the United States: results from the third national health and nutrition examination survey. *J Womens Health (Larchmt)* 13:713-718.
- Werth VP, Zhang W, Dortschbach K and Sullivan K (2000) Association of a promoter polymorphism of tumor necrosis factor-alpha with subacute cutaneous lupus erythematosus and distinct photoregulation of transcription. *J Invest Dermatol* 115:726-730.
- Wu J, Metz C, Xu X, Abe R, Gibson AW, Edberg JC, Cooke J, Xie F, Cooper GS and Kimberly RP (2003) A novel polymorphic CAAT/enhancer-binding protein beta element in the FasL gene promoter alters Fas ligand expression: a candidate background gene in African American systemic lupus erythematosus patients. *J Immunol* 170:132-138.

- Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH and Mountz JD (1996) Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* 98:1107-1113.
- Xiang N, Li XM, Wang GS, Tao JH and Li XP (2013) Association of Fas gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 40:407-415.
- Xue C, Lan-Lan W, Bei C, Jie C and Wei-Hua F (2006) Abnormal Fas/FasL and caspase-3-mediated apoptotic signaling pathways of T lymphocyte subset in patients with systemic lupus erythematosus. *Cell Immunol* 239:121-128.
- Yacoub Wasef SZ (2004) Gender differences in systemic lupus erythematosus. *Gend Med* 1:12-17.
- Yan B, Ye S, Chen G, Kuang M, Shen N and Chen S (2008) Dysfunctional CD4⁺,CD25⁺ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon-alpha-producing antigen-presenting cells. *Arthritis Rheum* 58:801-812.
- Yang X, Sun B, Wang H, Yin C, Wang X and Ji X (2015) Increased serum IL-10 in lupus patients promotes apoptosis of T cell subsets via the caspase 8 pathway initiated by Fas signaling. *J Biomed Res* 29:232-240.
- Yates J, Whittington A, Mitchell P, Lechler RI, Lightstone L and Lombardi G (2008) Natural regulatory T cells: number and function are normal in the majority of patients with lupus nephritis. *Clin Exp Immunol* 153:44-55.
- Yildir S, Sezgin M, Barlas IO, Turkoz G, Ankarali HC, Sahin G and Erdal ME (2013) Relation of the Fas and FasL gene polymorphisms with susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 33:2637-2645.
- Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ and Van Dyke T (1997) Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 385:637-640.
- Yonehara S, Ishii A and Yonehara M (1989) A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169:1747-1756.
- Zhan Y, Funda DP, Every AL, Fundova P, Purton JF, Liddicoat DR, Cole TJ, Godfrey DI, Brady JL, Mannering SI *et al.* (2004) TCR-mediated activation promotes GITR upregulation in T cells and resistance to glucocorticoid-induced death. *Int Immunol* 16:1315-1321.
- Zhang B, Zhang X, Tang F, Zhu L and Liu Y (2008a) Reduction of forkhead box P3 levels in CD4⁺CD25^{high} T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 153:182-187.
- Zhang B, Zhang X, Tang FL, Zhu LP, Liu Y and Lipsky PE (2008b) Clinical significance of increased CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 67:1037-1040.
- Zhuo W, Zhang Y, Xiang Z, Cai L and Chen Z (2009) Polymorphisms of TP53 codon 72 with breast carcinoma risk: evidence from 12226 cases and 10782 controls. *J Exp Clin Cancer Res* 28:115.
- Zimmermann-Nielsen E, Gronbaek H, Dahlerup JF, Baatrup G and Thorlacius-Ussing O (2005) Complement activation capacity in plasma before and during high-dose prednisolone treatment and tapering in exacerbations of Crohn's disease and ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol* 5:31.

ANEXOS

ANEXO I

CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

(Hochberg, 1997):

1. Rash malar

Eritema fixo, plano ou elevado, nas eminências malares, tendendo a poupar a região nasolabial

2. Rash Discóide

Placas eritematosas elevadas, ocorrendo cicatrização atrófica nas lesões antigas

3. Fotossensibilidade

Rash cutâneo resultante de reação incomum ao sol, por história do paciente ou observação do médico

4. Úlcera oral

Ulceração oral ou nasofaríngea, geralmente não dolorosa, observada pelo médico

5. Artrite

Artrite não – erosiva, envolvendo 2 ou mais articulações periféricas caracterizada por dor à palpação, edema ou derrame

6. Serosite

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

ou

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

7. Alteração renal

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

ou

(b) cilindros celulares: podem ser hematológico, granular, tubular ou misto

8. Alteração neurológica

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

Ou

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

9. Alteração hematológica

(a) anemia hemolítica – com reticulocitose

Ou

(b) leucopenia - < 4000/mm³ total em 2 ou mais ocasiões

Ou

(c) linfopenia - < 1500/mm³ em 2 ou mais ocasiões

Ou

(d) trombocitopenia - < 100 000/mm³ na ausência de drogas causadoras

10. Alteração imunológica

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

Ou

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

Ou

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

11. Anticorpo antinuclear (Tebbe & Orfanos)

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

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

ANEXO II

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

IDENTIFICAÇÃO:

n° _____

Nome: _____ Registro: _____ Sexo: F M
Raça: Branco Não branco
Data de nascimento: ___/___/___
Profissão: _____ Estado civil: _____
Naturalidade/Procedência: _____
Endereço: _____
Cidade: _____ CEP: _____ - ____
Telefones: _____

DATA DO INÍCIO DOS SINTOMAS: ___/___/___

DATA DO DIAGNÓSTICO: ___/___/___

MANIFESTAÇÕES INICIAIS NO DIAGNÓSTICO: _____

INÍCIO DO ACOMPANHAMENTO NO HCPA: ___/___/___

ÓBITO: S N DATA: ___/___/___

CAUSA: _____

CRITÉRIOS PARA CLASSIFICAÇÃO PARA LES (ACR 1997)

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

ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS ASSOCIADAS

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

TRATAMENTO REALIZADO

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

ANEXO III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTES

Caro(a) Senhor(a),

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é um grave problema de saúde que afeta pessoas no mundo todo. Alguns fatores presentes nas células e envolvidos no sistema de defesa do organismo (sistema imunológico) podem contribuir para um risco aumentado de desenvolver LES, não sendo completamente conhecidos até hoje. Este estudo está sendo realizado para tentar identificar estes possíveis fatores de risco para o desenvolvimento da doença e suas características clínicas. Por esse motivo, estamos convidando o(a) senhor(a) a nos ajudar a compreender as causas do LES, através de uma pesquisa científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, intitulada: “O papel das proteínas apoptóticas na patogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico”. Caso aceite, estamos solicitando a sua permissão para realizarmos **1 (uma) coleta de 10 mL de seu sangue**. Com ele, faremos estudos de substâncias presentes nas células do sistema de defesa que protegem ou determinam a morte (apoptose) destas células. A partir do sangue, também será extraído DNA, que será utilizado para a identificação de fatores que controlam a morte das mesmas células, e que podem estar associados ao desenvolvimento do LES e a forma como ele se apresenta. Além da coleta de sangue, também será preenchido um questionário com tempo estimado de, no máximo, 15 minutos.

POR QUE É IMPORTANTE PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Os participantes deste trabalho estarão auxiliando para o avanço e progresso do conhecimento sobre Lúpus. O conhecimento gerado poderá ajudar no estabelecimento de melhores tratamentos e no controle dos sintomas clínicos associados à doença.

QUAIS SÃO OS INCÔMODOS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

O risco associado com essa coleta de sangue é mínimo (dor) no local onde foi inserida a agulha.

DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO INDIVÍDUO

Os resultados de seu exame estarão disponíveis para o(a) senhor(a) assim que concluídos. O material obtido não será utilizado para fins comerciais. Fica garantida a privacidade dos indivíduos quanto aos dados envolvidos na pesquisa. Os dados gerados serão armazenados por 5 anos e estarão à inteira disposição do(a) senhor(a) para acompanhá-los. O(A) doador(a) tem a total liberdade de não querer entrar no estudo, ou de sair do mesmo, quando achar necessário, sem que isso traga prejuízos ao seu cuidado. Não há formas de ressarcimento decorrentes da participação na pesquisa, bem como os participantes da pesquisa não terão nenhum gasto.

O Prof. Dr. João Carlos Tavares Brenol e o Prof. Dr. Odirlei André Monticieleo são os pesquisadores responsáveis no HCPA, e o Prof. José Artur Bogo Chies e a aluna de doutorado Nadine Glesse são os responsáveis pela análise do material cedido pelo indivíduo. **Caso haja a necessidade de maiores explicações, o(a) senhor(a) poderá nos contactar através dos números (051) 2101 8340 (Dr. João C. T. Brenol); (051) 9652 6170 (Dr. Odirlei A. Monticieleo); (51) 3308-6740 (Prof. José Artur Bogo Chies); (051) 2101 8304 (Comitê de Pesquisa e Ética em Saúde) e através do endereço: UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500 – Campus do Vale, prédio 43.323 – sala 221 – Porto Alegre, ou ainda pelos emails: nadineglesse@hotmail.com e jabchies@terra.com.br.**

Eu, _____ abaixo assinado, recebi as informações sobre os objetivos e a importância desta pesquisa de forma clara e concordo em participar do estudo.

Declaro que também fui informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa;

- Da garantia que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações serão utilizadas somente para fins científicos do presente projeto de pesquisa.

Declaro que recebi cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ficando outra via com o pesquisador.

(Nome do pesquisador)

(Assinatura do pesquisador)

(Assinatura do sujeito da pesquisa)

Porto Alegre, _____ de _____ de 20____.

ANEXO IV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLES

Caro(a) Senhor(a),

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é um grave problema de saúde que afeta pessoas no mundo todo. Alguns fatores presentes nas células e envolvidos no sistema de defesa do organismo (sistema imunológico) podem contribuir para um risco aumentado de desenvolver LES, não sendo completamente conhecidos até hoje. Este estudo está sendo realizado para tentar identificar estes possíveis fatores de risco para o desenvolvimento da doença e suas manifestações clínicas. Para sabermos quais características estão associadas a esta doença, precisamos conhecer a sua frequência em pessoas saudáveis, para podermos comparar com os pacientes em estudo. Através das perguntas que lhe fizemos e da análise de determinadas substâncias presentes em suas células do sistema imunológico e de fatores presentes no seu DNA, consideramos que você tem baixa probabilidade de ter LES, podendo fazer parte de um grupo controle para a comparação. Por esse motivo, estamos convidando o(a) senhor(a) a nos ajudar a compreender as causas do LES, através de uma pesquisa científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, intitulada: “O papel das proteínas apoptóticas na patogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico”. Caso aceite, estamos solicitando a sua permissão para realizarmos **1 (uma) coleta de 10 mL de seu sangue**. Com a amostra de sangue, faremos a identificação de substâncias presentes em células do sistema imunológico que determinam a morte (apoptose) destas células. A partir do sangue, também será extraído DNA, que será utilizado para a identificação de possíveis fatores de risco que regulam a morte das mesmas células, e que podem estar associados ao desenvolvimento do LES e a forma como ele se apresenta. Além da coleta de sangue, também será preenchido um questionário com tempo estimado de, no máximo, 15 minutos.

POR QUE É IMPORTANTE PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Os participantes deste trabalho estarão auxiliando para o avanço e progresso do conhecimento sobre Lúpus. O conhecimento gerado poderá ajudar no estabelecimento de melhores tratamentos e no controle dos sintomas clínicos associados à doença.

QUAIS SÃO OS INCÔMODOS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

O risco associado com essa coleta de sangue é mínimo (dor) no local onde foi inserida a agulha.

DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO INDIVÍDUO

Os resultados de seu exame estarão disponíveis para o(a) senhor(a) assim que concluídos. O material obtido não será utilizado para fins comerciais. Fica garantida a privacidade dos indivíduos quanto aos dados envolvidos na pesquisa. Os dados gerados serão armazenados por 5 anos e estarão à inteira disposição do(a) senhor(a) para acompanhá-los. O(A) doador(a) tem a total liberdade de não querer entrar no estudo, ou de sair do mesmo, quando achar necessário, sem que isso traga prejuízos. Não há formas de ressarcimento decorrentes da participação na pesquisa, bem como os participantes da pesquisa não terão nenhum gasto.

O Prof. Dr. João Carlos Tavares Brenol e o Prof. Dr. Odirlei André Monticieleo são os pesquisadores responsáveis no HCPA, e o Prof. José Artur Bogo Chies e a aluna de doutorado Nadine Glesse são os responsáveis pela análise do material cedido pelo indivíduo. **Caso haja a necessidade de maiores explicações, o(a) senhor(a) poderá nos contactar através dos números (051) 2101 8340 (Dr. João C. T. Brenol); (051) 9652 6170 (Dr. Odirlei A. Monticieleo); (51) 3308-6740 (Prof. José Artur Bogo Chies); (051) 2101 8304 (Comitê de Pesquisa e Ética em Saúde) e através do endereço: UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500 – Campus do Vale, prédio 43.323 – sala 221 – Porto Alegre, ou ainda pelos emails: nadineglesse@hotmail.com e jabchies@terra.com.br.**

Eu, _____ abaixo assinado, recebi as informações sobre os objetivos e a importância desta pesquisa de forma clara e concordo em participar do estudo.

Declaro que também fui informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa;
- Da garantia que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações serão utilizadas somente para fins científicos do presente projeto de pesquisa.

Declaro que recebi cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ficando outra via com o pesquisador.

(Nome do pesquisador)

(Assinatura do pesquisador)

(Assinatura do sujeito da pesquisa)

Porto Alegre, _____ de _____ de 20____.

ANEXO V

QUESTIONÁRIO PARA AVALIAÇÃO DO GRUPO CONTROLE

IDENTIFICAÇÃO:

n° _____

Sexo: F M

Etnia: Branco Não branco

Data de nascimento: ___/___/___

Profissão: _____ Estado civil: _____

Naturalidade/Procedência: _____

Cidade onde reside: _____

HÁ HISTÓRICO DE DOENÇAS AUTOIMUNES NA FAMÍLIA? Sim Não

Se sim, qual a doença? _____

VOCÊ APRESENTOU ALGUMA INFECÇÃO OU FEBRE NAS ÚLTIMAS SEMANAS? Sim Não

USOU ALGUM MEDICAMENTO? _____

É FUMANTE? Sim Não

EX-FUMANTE? Sim Não

APRESENTA ALGUMA(S) DAS CONDIÇÕES ABAIXO LISTADAS?

Hipertensão

Diabetes

Obesidade

Gravidez

FAZ USO CONTÍNUO DE ALGUMA MEDICAÇÃO? Sim Não

Se sim, qual o medicamento? _____

Há quanto tempo? _____