

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Instituto de Biociências**  
**Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular**  
**Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética**

**TESE DE DOUTORADO**

**BASES GENÉTICAS E MOLECULARES DA ARTRITE REUMATOIDE:  
INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DOS RECEPTORES NKG2 E DOS FATORES DE  
APOPTOSE NA SUSCEPTIBILIDADE E PATOGÊNESE DA DOENÇA**

**Aluna de doutorado: Maria Cristina Cotta Matte**

**Orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies**

**Porto Alegre**

**Junho de 2018**

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**BASES GENÉTICAS E MOLECULARES DA ARTRITE REUMATOIDE:  
INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DOS RECEPTORES NKG2 E DOS FATORES DE  
APOPTOSE NA SUSCEPTIBILIDADE E PATOGÊNESE DA DOENÇA**

**MARIA CRISTINA COTTA MATTE**

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).

**Prof. Dr. José Artur Bogo Chies**

**Orientador**

**Porto Alegre**

**Junho de 2018**

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

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

### **Agências Financiadoras**

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

### **Instituição de Origem**

Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética – Departamento de Genética  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

### **Instituições colaboradoras**

Serviço de Reumatologia  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Serviço de Reumatologia  
Hospital Nossa Senhora da Conceição/Grupo Hospitalar Conceição (GHC)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha família pelo apoio e incentivo em toda minha trajetória acadêmica;

Ao Felipe pelo amor, compreensão e apoio incondicional nos momentos mais difíceis;

Aos meus colegas e ex-colegas de laboratório, em especial Joel, Valéria, Nadine, Jacqueline, Francis, Rafael, Tiago, Brenda, Bruno e Bruna por todo auxílio na realização das atividades desse estudo e pelo companheirismo ao longo desses anos;

Ao Prof. Dr. José Artur Bogo Chies (o Zéca), por me acompanhar durante 8 anos da minha formação. Obrigada por sempre me incentivar e por me apoiar em decisões dentro e fora do laboratório. Deixo aqui registrado meu carinho e admiração;

Aos Serviços de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Hospital Nossa Senhora da Conceição, representados na figura do Dr. Markus Bredemeier e Dr. Claiton Brenol, pela significativa contribuição na realização desse trabalho;

À Associação Hospitalar Moinhos de Vento, na figura da Dra. Gisele Nader Bastos por permitir e incentivar a minha formação acadêmica e a concretização desse trabalho;

Meu sincero agradecimento a todos os pacientes que aceitaram participar deste trabalho.

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS.....   | 5   |
| LISTA DE FIGURAS .....   | 7   |
| RESUMO .....   | 8   |
| ABSTRACT .....   | 9   |
| CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....  | 13  |
| A Artrite Reumatoide.....  | 13  |
| A patogênese da AR .....   | 17  |
| As células <i>Natural Killer</i> e os receptores NKG2.....   | 24  |
| As células <i>Natural Killer</i> e os receptores NKG2 na AR .....  | 30  |
| Polimorfismos de NKG2 na AR .....  | 33  |
| O processo de apoptose.....  | 34  |
| A apoptose na AR .....   | 38  |
| O sistema FAS/FASL .....   | 40  |
| A família BCL-2 .....  | 42  |
| A proteína p53 .....   | 43  |
| CAPÍTULO 2: JUSTIFICATIVA .....  | 47  |
| CAPÍTULO 3: OBJETIVOS .....  | 50  |
| CAPÍTULO 4: ARTIGO ORIGINAL 1 .....  | 52  |
| CAPÍTULO 5: ARTIGO ORIGINAL 2 .....  | 74  |
| CAPÍTULO 6: ARTIGO ORIGINAL 3 .....  | 96  |
| CAPÍTULO 7: DISCUSSÃO .....  | 118 |
| REFERÊNCIAS .....  | 127 |
| ANEXOS .....   | 138 |
| Anexo 1. Resultados preliminares de análises do perfil das células NK por citometria de fluxo em sangue periférico e líquido sinovial de pacientes com AR e OA. ....   | 138 |
| Anexo 2. Artigo científico .....   | 140 |
| Anexo 3. Resultado das frequências genotípicas e alélicas de polimorfismos em <i>NKG2</i> em 362 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e 425 controles saudáveis. Artigo científico em preparação “ <i>Influence of polymorphic variants in NKG2 genes and their role in systemic lupus erythematosus susceptibility and clinical progression</i> ”..... | 149 |
| Anexo 4. Artigo científico .....   | 150 |
| Anexo 5. Artigo científico .....   | 151 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACR - Colégio Americano de Reumatologia/ *American College of Rheumatology*
- Anti-CCP - Anticorpos antipeptídeo cíclico citrulinado
- Apaf-1 – Fator de ativação de apoptose 1
- AR – Artrite reumatoide
- BAK – Proteína proapoptótica de domínio BH3-only antagonista/exterminadora homóloga à Bcl-2
- 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
- BID - Proteína proapoptótica de domínio BH3-only agonista da morte celular
- CD – Grupo de diferenciação
- c-FLIP - *FLICE-like inhibitory protein*
- DAP - Proteína adaptadora
- DAS – Escore de atividade da doença / *Disease Activity Score*
- DISC – Complexo de sinalização de morte / *death-inducing signaling complex*
- DMCD - Drogas modificadoras do curso da doença
- DR – Receptor de morte / *death receptor*
- EULAR – Liga europeia contra doenças reumáticas / *European League Against Rheumatism*
- FADD – Proteína FAS associada com domínio de morte
- FAS – Proteína Fas
- FASL – Proteína ligante de Fas
- Fc - Fragmento cristalizável
- FR – Fator reumatoide
- GWAS - Estudos de associação genômica ampla / *Genome-wide association study*
- HLA - Antígeno leucocitário humano / *Hman Leukocyte Antigen*
- IAP – Proteína inibidora de apoptose / *inhibitors of apoptosis proteins*
- IFN - Interferon
- Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

ITAM - *Immunoreceptor tyrosine-based activating motif*

ITIM - *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*

KIR – Receptor do tipo imunoglobulina da célula NK / *Killer Ig-like Receptor*

KLR -Receptores de NK homólogos às lectinas / *killer cell lectin-like receptor*

MEA – Manifestações extra-articulares

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade / *Major histocompatibility complex*

MIC - *MHC class I chain-related protein*

mRNA – RNA mensageiro

NK - Célula *natural killer*

PAD - Peptidil arginina deiminase

PCR – Proteína C reativa

PI3K - *Phosphatidylinositol-3 kinase*

PUMA - *p53 upregulated modulator of apoptosis*

SE – Epítipo compartilhado / Shared epitope

sFas – Fas solúvel

sFasL – Fas ligante solúvel

STAT1 - *Signal transducer and activator of transcription 1*

Th – Célula T helper

TNF - Fator de necrose tumoral

TNFR - Receptor do fator de necrose tumoral

TP53 – Gene supressor tumoral p53

TRAIL - *TNF-related apoptosis inducing ligand*

Treg – Célula T regulatória ou linfócito T regulador

ULBP – Proteína ligadora de UL16 / *UL16 binding protein*

UTR – Região não traduzida / *untranslated region*

VSG – Velocidade de sedimentação globular

VHS – Velocidade de hemossedimentação

## LISTA DE FIGURAS

|   |     |
|---|-----|
| Figura 1. Prevalência mundial de AR em adultos.....   | 14  |
| Figura 2. Representação esquemática do desenvolvimento de AR em indivíduos Anti-CCP positivos. ....                       | 20  |
| Figura 3. Representação esquemática de uma articulação normal (a) e de articulação afetada na AR (b). ....                | 20  |
| Figura 4. A articulação sinovial na AR.....   | 21  |
| Figura 5. Representação esquemática do mecanismo imunopatológico envolvido na AR. ....                                    | 23  |
| Figura 6. Representação dos genes CD94/NKG2 e seus produtos. ....   | 27  |
| Figura 7. Representação dos blocos haplotípicos hb-1 e hb-2 de NKG2D/NKG2A. ....  | 29  |
| Figura 8. Representação esquemática das vias extrínseca e intrínseca de apoptose. ....                                    | 37  |
| Figura 9: Representação esquemática da interação entre células NK, receptores NKG2, fatores de apoptose e inflamação..... | 119 |



## RESUMO

A Artrite Reumatoide (AR) é caracterizada como uma doença autoimune e de caráter sistêmico altamente debilitante. Acredita-se que esta patologia apresenta uma etiologia multifatorial, visto que fatores genéticos e ambientais influenciam no desenvolvimento da doença. A inflamação crônica e progressiva presente nas articulações sinoviais é uma das principais características da AR, juntamente com o desenvolvimento de um processo hiperplásico que resulta na formação de um tecido invasor conhecido como *pannus*. A medida que a doença evolui, esses processos promovem a degradação de ossos e cartilagens da articulação de forma irreversível.

Diversos mecanismos celulares estão envolvidos na patogênese da AR, dentre eles a apoptose destaca-se como um dos eventos centrais, uma vez que esse processo parece atuar diretamente no desenvolvimento da hiperplasia sinovial bem como contribuir para a persistência de células do sistema imune na articulação sinovial e, desta forma, para a perpetuação do processo inflamatório.

As células *Natural Killer* exercem um importante papel imunomodulatório através da liberação de citocinas como TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  na articulação sinovial. No líquido sinovial de pacientes com AR, as células NK apresentam um perfil fenotípico diferenciado, caracterizado pela elevada expressão de CD56 e receptores CD94/NKG2, os quais determinam um maior potencial de sinalização em detrimento da atividade citotóxica. Ainda, acredita-se que a expressão desses receptores está associada a menores taxas de apoptose, contribuindo para o acúmulo dessas células na articulação.

A apoptose é um evento celular regulado por uma intrincada rede de moléculas como Fas, FasL, família Bcl-2, p53 e caspases, sendo um processo importante na manutenção do equilíbrio do organismo. Na AR, apesar de várias células mostrarem-se susceptíveis aos eventos de apoptose *in vitro*, baixas taxas de apoptose são observadas *in vivo*. Acredita-se que há um prejuízo na indução de apoptose no contexto inflamatório da AR. Esse prejuízo pode estar relacionado a diferentes fatores como: a presença de Fas e FasL solúveis, expressão de fatores anti-apoptóticos como Bcl-2 por fibroblastos sinoviais e mutações em p53.

Considerando todos esses aspectos, o presente trabalho teve como objetivo contribuir para a compreensão do papel dos receptores NKG2, dos fatores de apoptose e de citocinas na susceptibilidade e patogênese da AR. A investigação dos polimorfismos

nos genes NKG2 não evidenciou qualquer relação das variantes NKG2A, NKG2C e NKG2D com a susceptibilidade ou a severidade à AR. Com relação ao papel dos polimorfismos em genes que codificam proteínas de apoptose, identificamos as variantes FAS -670AA e BCL-2 -938CC como potenciais marcadores de susceptibilidade à doença, e as variantes FAS -1377GG e TP53 Pro/Pro como fatores importantes na modulação da severidade da AR. Na investigação da contribuição dos fatores solúveis sFas, sFasL e citocinas na patofisiologia da AR, destacaram-se a participação dos fatores sFas, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ .

## ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is characterized as a systemic and highly debilitating autoimmune disease. It is believed that the development of the disease has a multifactorial etiology, since genetic and environmental factors are associated to its susceptibility. The major features of RA include a chronic and progressive inflammation in the synovial joints, along with the development of a hyperplastic process that results in a growing of an invading tissue known as *pannus*. As disease progress, irreversible bone and cartilage destruction is observed.

The RA pathogenesis is regulated by several and distinct molecular mechanisms. Among them, apoptosis stands out as one of the central events, since this process seems to act directly in the development of synovial hyperplasia, as well as, may contribute to the immune system cells survival in the synovial joint and consequently, lead to the perpetuation of the inflammatory process.

Natural Killer (NK) cells plays an important immunomodulatory role through the release of cytokines, as TNF- $\alpha$  and INF- $\gamma$  into the synovial joint. In the synovial fluid of RA patients, NK cells shows an distinct phenotype - characterized by the high expression of CD56 and CD94/NKG2 receptors - which determine a greater potential of signaling in detriment of the cytotoxic activity. Furthermore, it is suggested that the expression of NKG2 receptors is associated to lower apoptosis rates, contributing to the accumulation of these cells in the synovial joint.

Apoptosis is a cellular event regulated by an intricate network of molecules such as Fas, FasL, Bcl-2 family, p53 and caspases. In addition, apoptosis is an important process involved in body's homeostasis maintenance. In RA, although several cells seems to be susceptible to apoptosis events *in vitro*, low rates of apoptosis are observed *in vivo*. The most acceptable hypothesis is related to an apoptosis impairment, which may be related to different factors as the presence of soluble Fas and FasL molecules, expression of anti-apoptotic factors such as Bcl-2 by synovial fibroblasts and mutations in p53.

Taking into account all these facts, the present thesis aimed to contribute to the understanding of NKG2 receptors, apoptosis factors and cytokines role in the susceptibility and pathogenesis of RA. Investigation of the *NKG2* polymorphisms showed no relationship of the *NKG2A*, *NKG2C* and *NKG2D* variants with RA susceptibility or severity. Considering the role of polymorphisms in the genes that encodes apoptosis

proteins, we identified *FAS-670AA* and *BCL-2-938CC* variants as potential disease susceptibility markers, and the *FAS-1377GG* and *TP53Pro/Pro* variants as important modulation factors of RA severity. The investigation of the soluble factors as sFas, sFasL and cytokines contribution in the pathophysiology of RA, the participation of the sFas, IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  factors was highlighted.

**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUÇÃO**

# **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO**

## **A Artrite Reumatoide**

A Artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica, inflamatória e crônica de etiologia autoimune. Caracteriza-se pela presença de sinovite periférica simétrica e erosiva, acometendo majoritariamente as articulações sinoviais do corpo humano, levando à destruição óssea e cartilaginosa. Conforme a doença progride, esta pode acometer outros órgãos, como coração, pulmão, entre outros (LEE; WEINBLATT, 2001).

A AR é considerada uma das doenças autoimunes mais frequentes no mundo, atingindo de 0,5 a 1% da população mundial (pode chegar a 5% em grupos e faixas etárias específicas) (Figura 1) (SHAPIRA; AGMON-LEVIN; SHOENFELD, 2010). No Brasil, a prevalência se assemelha aos dados mundiais. Um estudo conduzido por Senna e colaboradores identificou uma prevalência de 0,46%, o que representa aproximadamente um milhão de pessoas com essa doença (SENNA et al., 2004). Esses dados confirmam estimativas prévias da literatura, que apontavam para uma prevalência de AR em adultos de 0,2%-1% (MARQUES-NETO et al, 1993). Observa-se um predomínio da AR no sexo feminino (frequência de 2,5 a 3 vezes superior quando comparada ao sexo masculino) com surgimento entre a quarta e sexta década de vida, sendo observado o aumento da incidência da doença com o aumento da idade (LEE; WEINBLATT, 2001; SHAPIRA; AGMON-LEVIN; SHOENFELD, 2010).

A AR é uma doença que apresenta um significativo impacto econômico-social, uma vez que a maioria dos pacientes apresenta limitações no desenvolvimento de suas atividades cotidianas, devido às lesões nas articulações sinoviais. Além disso, estima-se que o índice de afastamento do trabalho pode chegar a 60% após 15 anos da doença. A mortalidade também é alta, sendo proporcional à gravidade do quadro. A expectativa de vida pode cair de três a dez anos, dependendo da gravidade e da idade de início da doença. Estima-se que pacientes com formas poliarticulares da AR podem ter sobrevida de 40% em 5 anos (GOELDNER et al., 2011).

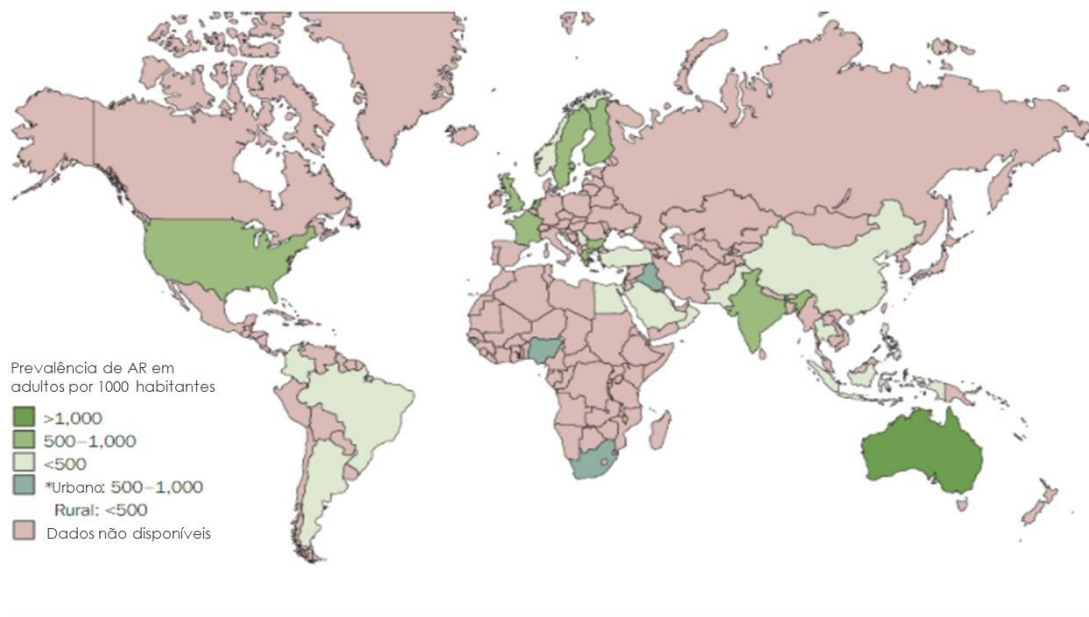


Figura 1. Prevalência mundial de AR em adultos. A cor verde-escuro destaca regiões que apresentam elevada prevalência de AR (por exemplo, Austrália), enquanto regiões destacadas na cor verde-clara (por exemplo, Brasil) possuem menor frequência. Observa-se ainda, extensa área territorial com dados não disponíveis. Adaptado de SHAPIRA; AGMON-LEVIN; SHOENFELD, 2010.

As doenças cardiovasculares, doenças cerebrovasculares, infecções, doenças linfoproliferativas e complicações gastrointestinais estão descritas como as principais causas de óbitos entre os pacientes com AR. Dentre os fatores preditivos de mortalidade, estão incluídos: idade avançada, incapacidade funcional, número de articulações acometidas, fator reumatoide (FR) positivo, nódulos reumatoides e velocidade de sedimentação globular (VSG - também conhecida como velocidade de hemossedimentação [VHS]) elevada (BRENOL et al., 2007; DE CAMPOS et al., 2016; LÓPEZ-MEJÍAS et al., 2016).

O curso clínico da doença é extremamente variável entre os pacientes podendo envolver de limitações físicas pequenas até inflamação progressiva e sistêmica. Os principais sintomas observados em pacientes portadores de AR são dor, edema, calor e vermelhidão em qualquer articulação do corpo, em especial nas mãos e punhos. Comumente observa-se dor e rigidez matinal com duração maior que uma hora nas articulações inflamadas, além de fraqueza, fadiga, febre, perda de peso, depressão e mal-estar (LEE; WEINBLATT, 2001).

O processo inflamatório pode se estender para sistemas e órgãos, ocasionando o que é denominado de manifestações extra-articulares (MEA). Não há um consenso

internacional sobre a classificação das MEA, o que limita as comparações entre diferentes estudos publicados. São exemplos de MEA comumente descritas na literatura: nódulos reumatoides, pericardite, derrame pericárdico, pleurite, derrame pleural, doença pulmonar intersticial, hipertensão da artéria pulmonar, síndrome de Caplan, síndrome de Felty, anemia de doença crônica, trombocitose, neuropatia, esclerite, episclerite, escleromalácia perforans, glomerulonefrite, úlceras cutâneas, vasculites, tenossinovite de De Quervain, amiloidose e Síndrome de Sjögren. Estima-se que 40% dos pacientes apresentem MEA em algum momento do curso da doença, sendo a presença dessas manifestações correlacionada com pior prognóstico da doença (GOELDNER et al., 2011; MOURA et al., 2012; YOUNG; KODURI, 2007).

O aprimoramento dos métodos laboratoriais e de imagem permite a detecção e diagnóstico precoce da doença. O reconhecimento precoce da AR é essencial para o tratamento adequado dos pacientes, evitando a evolução do quadro para formas mais agressivas da doença. Atualmente, o diagnóstico de AR é estabelecido com base no conjunto de achados clínicos, radiológicos e laboratoriais. Os critérios propostos pelo *American College of Rheumatology* (ACR) e *European League Against Rheumatism* (EULAR) em 2010 (Tabela 1) - os quais se baseiam em um sistema de pontuação por meio de um escore de soma direta - auxiliam no estabelecimento do diagnóstico clínico de AR. As manifestações são divididas em quatro domínios: acometimento articular, sorologia, duração dos sintomas e provas de atividade inflamatória. Uma pontuação maior ou igual a seis é necessária para classificação definitiva de um paciente com AR (ALETAHA et al., 2010; DA MOTA et al., 2013).

Considerando que o próprio diagnóstico da AR baseia-se na identificação de condições e marcadores a partir da doença estabelecida, ainda não há características específicas que possibilitem a distinção da AR de outras artrites na sua fase inicial. O período inicial da doença (AR inicial), conhecido como os doze primeiros meses de sintomatologia, configura uma janela de oportunidade terapêutica, isto é, um momento em que a intervenção farmacológica efetiva pode mudar o curso da AR, pois a maior parte das lesões erosivas se estabelece nos dois primeiros anos da doença (DA MOTA; LAURINDO; NETO, 2010b).

Dentre as provas sorológicas, a presença de FR e Anticorpos anti-peptídeo cíclico citrulinado (Anti-CCP) é rotineiramente utilizada para a diferenciação de AR de outras patologias. O FR representa um grupo de autoanticorpos caracterizados pela habilidade



de reagir com determinados epítomos da porção fragmento cristalizável (Fc) da imunoglobulina (Ig) G. Suas sensibilidade e especificidade são de aproximadamente 80% e 70% para o diagnóstico de AR, respectivamente (ALETAHA; BLÜML, 2016; GOELDNER et al., 2011).

Tabela 1. Critérios classificatórios para AR 2010 *ACR/EULAR*.

| <b>A. Acometimento articular (0-5)</b>  | <b>Escore</b> |
|---|---------------|
| 1 grande articulação  | 0             |
| 2 -10 grandes articulações  | 1             |
| 1 - 3 pequenas articulações (com ou sem envolvimento de grandes articulações) | 2             |
| 4 -10 pequenas articulações (com ou sem envolvimento de grandes articulações) | 3             |
| > 10 articulações (pelo menos uma pequena)                                    | 5             |
| <b>B. Sorologia (0-3)</b>   |               |
| FR e Anti-CCP negativos   | 0             |
| FR e Anti-CCP positivo (baixos títulos)                                       | 2             |
| FR e Anti-CCP positivo (altos títulos)  | 3             |
| <b>C. Provas de Atividade Inflamatória</b>                                    |               |
| Proteína C Reativa (PCR) e VHS normal   | 0             |
| PCR e VHS alterados   | 1             |
| <b>D. Duração dos Sintomas (0-1)</b>  |               |
| < 6 semanas   | 0             |
| ≥ 6 semanas   | 1             |

São consideradas articulações pequenas: metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais, metatarsofalangeanas (segunda a quinta), primeira interfalangeana e punhos. Grandes articulações são: ombros, cotovelos, quadril, joelhos e tornozelos. No domínio “sorologia”, considera-se o resultado de fator reumatoide ou de anticorpos anti-peptídeos citrulinados negativo se o valor encontrado for igual ou menor ao limite superior da normalidade para o respectivo laboratório; positivo baixo se o resultado encontrado for maior que o limite superior da normalidade, mas menor ou igual três vezes o limite superior da normalidade; e positivo alto quando o valor encontrado for superior a três vezes o limite superior da normalidade. O domínio “duração dos sintomas” refere-se ao relato do próprio paciente quanto à duração máxima dos sinais e sintomas de qualquer articulação que esteja clinicamente envolvida no momento da avaliação. Já as “provas de atividade inflamatória” (VHS e PCR) são consideradas normais ou anormais de acordo com o valor de referência do laboratório utilizado. Adaptado de DA MOTA et al., 2013.

Os anticorpos anti-CCP, por sua vez, têm sensibilidade de 67% e especificidade de 95% para o diagnóstico de AR. Esses anticorpos são produzidos localmente na

membrana sinovial inflamada e no líquido sinovial de pacientes com AR e são capazes de reagir contra diversos peptídeos citrulinados. A citrulinização consiste na modificação pós-traducional de determinada proteína, na qual um resíduo de arginina é convertido em citrulina. Esse processo é catalisado pela enzima peptidil arginina deiminase (PAD) e neutraliza o caráter fortemente básico da arginina. Uma vez que os autoanticorpos podem ser detectados em fases precoces da AR, sua utilidade diagnóstica e prognóstica é notável, sendo sua presença considerada como marcadora de pior prognóstico (ALARCON; ANDRADE, 2007; ALETAHA; BLÜML, 2016).

O tratamento medicamentoso de AR inclui o uso de anti-inflamatórios não esteroidais, glicocorticoides, drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) - sintéticas e biológicas - e imunossupressores. Os principais objetivos do tratamento são: reduzir a dor, o edema articular e os sintomas constitucionais como a fadiga, melhorar a função articular, interromper a progressão do dano ósseo-cartilaginoso, prevenir incapacidades e reduzir a morbimortalidade (DA MOTA; LAURINDO; NETO, 2010a).

Uma vez estabelecido o tratamento, monitoração estrita da atividade da doença, progressão radiográfica e avaliação do prognóstico são fundamentais no acompanhamento do paciente com AR. Atualmente, na prática clínica, o escore conhecido por DAS (do inglês, *Disease Activity Score*) é utilizado como índice para medida da atividade da AR. O escore DAS28 leva em consideração o número de articulações dolorosas e edemaciadas (entre 28 articulações avaliadas), os níveis VHS e PCR, e a avaliação global de saúde ou da atividade da doença feita pelo paciente (DA MOTA; LAURINDO; NETO, 2010a; LAURINDO et al., 2004). O uso desse índice ainda permite categorizar o paciente em diferentes faixas de atividade da doença: em remissão (escore  $\leq 2,6$ ), atividade leve (escore  $> 2,6$  e  $\leq 3,2$ ), moderada (escore  $> 3,2$  e  $\leq 5,1$ ) e alta (escore  $> 5,1$ ). O objetivo do tratamento da AR deve ser sempre pautado em se atingir a mínima atividade de doença ou a remissão, sendo esse último estágio uma forma de se evitar a evolução para formas erosivas e potencialmente deformantes (PINHEIRO, 2007).

## **A patogênese da AR**

Assim como muitas outras doenças autoimunes, a AR caracteriza-se por uma etiologia multifatorial. Padrões epidemiológicos demonstram uma influência de fatores genéticos, socioeconômicos e infecções no desenvolvimento da doença. A observação do

aumento da incidência de AR entre indivíduos geneticamente relacionados, principalmente entre gêmeos monozigóticos aponta para a existência de componentes genéticos em sua etiopatogênese. Análises de herdabilidade sugerem que aproximadamente 60% da suscetibilidade à AR pode ser determinada pela presença de fatores genéticos (GOELDNER et al., 2011).

Os fatores genéticos associados ao desenvolvimento de AR podem ser classificados em dois grandes grupos: genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC do inglês, *major histocompatibility complex*) - também conhecido como antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês, *human leukocyte antigen*) - e genes fora do complexo MHC. Até o momento, a associação genética mais clara descrita refere-se à presença do alelo HLA-DRB1 (MCINNES; SCHETT, 2011; TOBÓN; YOUINOU; SARAUX, 2010).

Os alelos HLA-DRB1 compartilham uma sequência conservada de aminoácidos glutamina-leucina-arginina-alanina-alanina nas posições 70-74 da terceira região de hipervariabilidade da cadeia beta da molécula de HLA. Essa sequência específica de aminoácidos é conhecida como epítipo compartilhado e designa o alelo HLA-SE (SE, do inglês *shared epitope*) (PERRICONE; CECCARELLI; VALESINI, 2011). Estudos da literatura demonstram que a associação entre HLA-DRB1 e AR é mais forte em pacientes anti-CCP positivos, quando comparado a pacientes soronegativos para este mesmo tipo de anticorpo. Ainda, diferenças entre os alelos na predisposição à doença são observadas, sendo os alelos DRB1\*04:01 e \*04:04 os que apresentam associações mais claras com o desenvolvimento de AR (FUGGER; SVEJGAARD; SYGEHUS, 2000). Ainda não há um consenso sobre os mecanismos biológicos que permeiam a associação de HLA-DRB1 e a AR, no entanto, uma das hipóteses mais aceitas refere-se à interação entre gene e ambiente, a qual promove a perda de tolerância a proteínas próprias que contêm resíduos citrulinados. Acredita-se que o papel dos alelos HLA-DRB1 esteja relacionado à apresentação desses peptídeos citrulinados, os quais seriam reconhecidos como não-próprios por células do sistema imune. Nesse contexto, uma resposta contra esses antígenos, mediada por linfócitos T e B autorreativos, se instalaria na articulação dando início ao processo inflamatório (MCINNES; SCHETT, 2011; MIYADERA; TOKUNAGA, 2015).

Além dos alelos HLA, estudos de associação genômica ampla, conhecidos por GWAS (do inglês, *genome-wide association study*), já identificaram mais de 100

variantes genéticas associadas ao desenvolvimento de AR. Dentre essas, destacam-se polimorfismos nos genes *PTPN22*, *TRAF1-C5*, *PADI4*, *STAT4*. Contudo, apesar de sua importância, a presença de variações nesses genes parece responder por somente de 3-5% da influência genética total observada na AR (PERRICONE; CECCARELLI; VALESINI, 2011).

Com relação aos fatores ambientais, o tabagismo é considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento e severidade da AR, além de estar relacionado ao desenvolvimento de manifestações extra-articulares e à presença de autoanticorpos. O risco de desenvolvimento da AR aumenta linearmente conforme a duração e o número de cigarros consumidos e mantém-se elevado mesmo após a cessação tabágica. O risco de desenvolvimento de AR associado ao tabagismo ainda é modificado pelo número de cópias de alelos HLA-SE do indivíduo, o que sugere uma forte interação gene-ambiente (Figura 2) (GOELDNER et al., 2011; LIAO; ALFREDSSON; KARLSON, 2010; MCINNES; SCHETT, 2011).

O evento inicial da AR parece estar relacionado à entrada de antígenos no tecido sinovial, os quais estimulam uma resposta imunológica local que acarreta o desenvolvimento de sinovite. Em condições normais, a membrana sinovial é relativamente acelular, apresentando poucos macrófagos junto a um tecido composto por fibroblastos sinoviais e alguns vasos sanguíneos. Com o início do processo inflamatório, observa-se um remodelamento da sinóvia com a expansão do número de células presentes na membrana sinovial (hiperplasia celular), influxo de células do sistema imune inato (macrófagos, células dendríticas, *Natural Killer*, entre outras) e adaptativo (linfócitos T e B), e ocorrência de neoangiogênese (Figura 3) (CHOY, 2012; LEE; WEINBLATT, 2001; STRAND; KIMBERLY; ISAACS, 2007).

O processo hiperplásico da membrana sinovial associado à inflamação continuada leva a formação de um tecido invasor conhecido como *pannus* (Figura 4). O *pannus* é um tecido composto de fibroblastos e macrófagos que se expande na cartilagem e invade a matriz óssea. Além das células anteriormente mencionadas, observa-se a ação local de osteoclastos, que destroem o osso, enquanto enzimas secretadas por neutrófilos, sinoviócitos e condrócitos degradam a cartilagem (CHOY, 2012; SHIOZAWA et al., 2011).

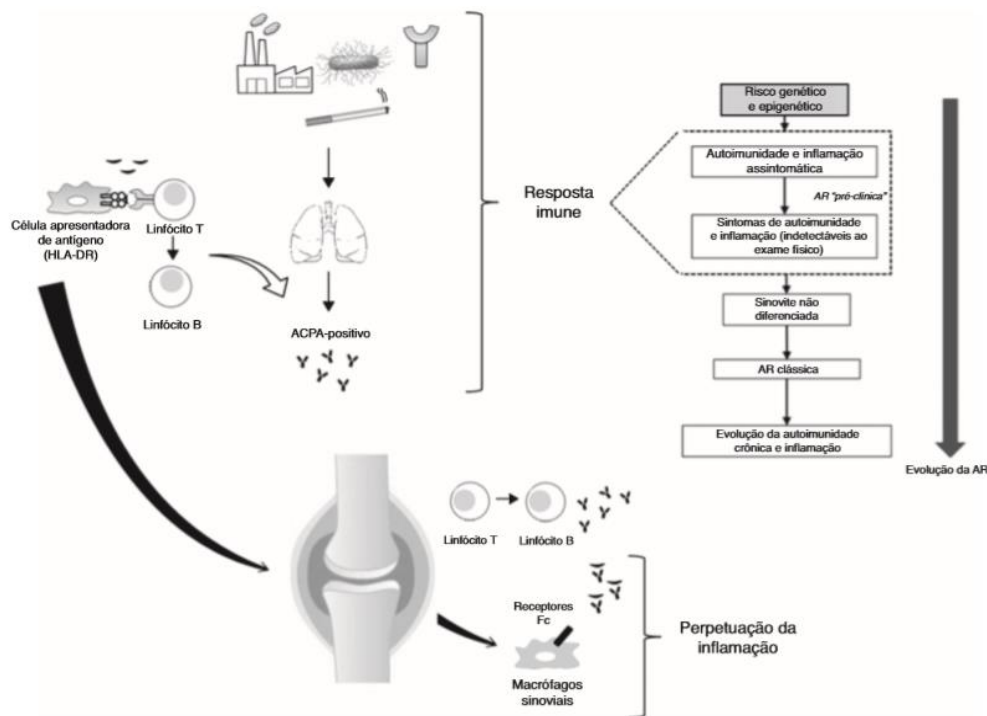


Figura 2. Representação esquemática do desenvolvimento de AR em indivíduos Anti-CCP positivos. Em uma fase inicial, a interação entre fatores genéticos e fatores ambientais promove a ativação da resposta imunológica contra o próprio. O fumo, entre outros fatores ambientais, promove a citrulinização de peptídeos, os quais se ligam a moléculas HLA-DR de células apresentadoras de antígenos, sendo o complexo peptídeo-HLA reconhecido como não próprio por linfócitos T. A citrulinização de proteínas na articulação também promove a ativação de células B do sistema imune que promovem a produção de autoanticorpos e contribuem para a perpetuação do processo inflamatório. Adaptado de CASTRO-SANTOSA; DÍAZ-PEÑA, 2016.

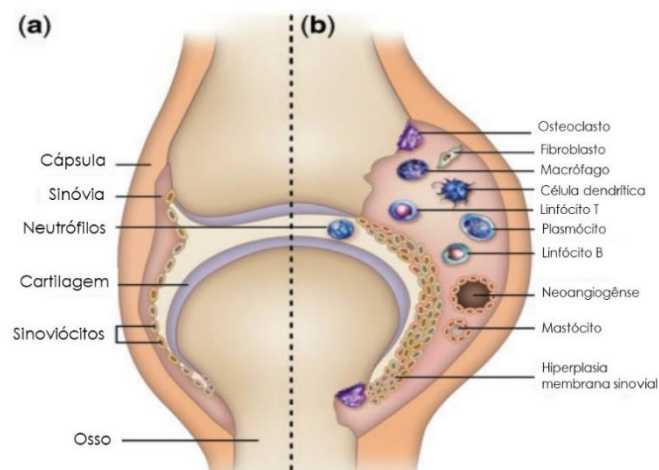


Figura 3. Representação esquemática de uma articulação normal (a) e de articulação afetada na AR (b). Na articulação de pacientes com AR observa-se o influxo de células do sistema imune, uma hiperplasia da membrana sinovial e eventos de neoangiogênese. Adaptado de STRAND; KIMBERLY; ISAACS, 2007.

Os fibroblastos sinoviais apresentam um importante papel no remodelamento tecidual que caracteriza a AR, pois essas células apresentam alto potencial migratório, alto potencial de proliferação, promovem ativação de condrócitos e liberam elevados níveis de metaloproteinases, as quais estão envolvidas na destruição da cartilagem articular. Além disso, os fibroblastos sinoviais participam do recrutamento, retenção e ativação de leucócitos no sítio inflamatório através da liberação de citocinas e quimiocinas específicas (FIRESTEIN; MCINNES, 2017).

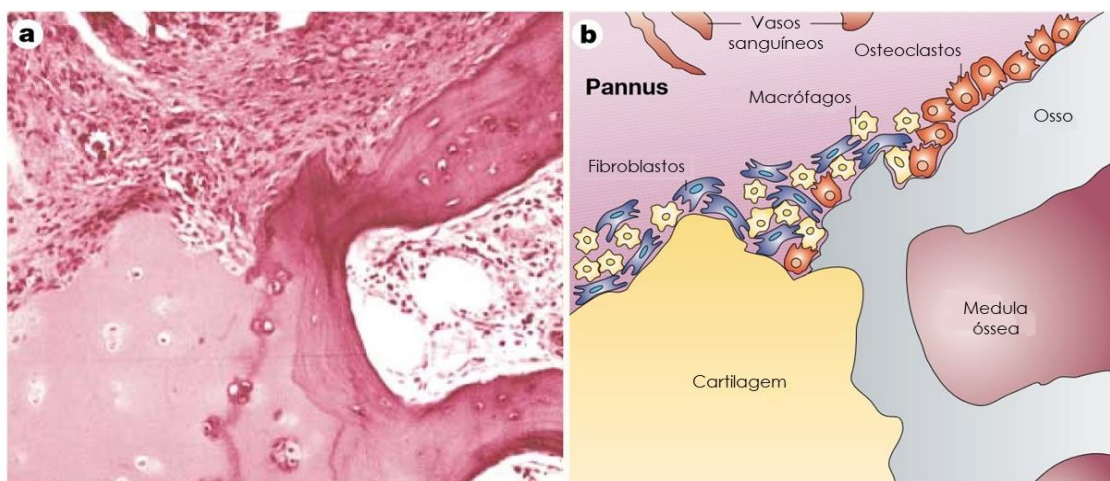


Figura 4. A articulação sinovial na AR. (a) imagem histológica da presença de *pannus* em tornozelo de um paciente com artrite reumatoide. (b) representação esquemática da imagem. Presença de tecido erosivo conhecido como *pannus*. Esse tecido contém macrófagos, fibroblastos e osteoclastos, que contribuem para a destruição da cartilagem e do osso. Observa-se a presença de vasos sanguíneos, os quais são importantes para o fluxo de células inflamatórias à articulação, como monócitos e linfócitos. Adaptado de POPE, 2002.

As primeiras evidências sobre os potenciais mecanismos da patogênese da AR começaram a surgir após a identificação do FR no soro de pacientes portadores da doença, indicando que a AR poderia ser uma doença autoimune provocada pela reatividade de autoanticorpos. Atualmente, sabe-se que aproximadamente 70-80% dos pacientes apresentam o FR e/ou Anti-CCP no soro e que sua presença está relacionada a uma doença mais agressiva e destrutiva (FIRESTEIN, 2003).

A produção de autoanticorpos como FR e anti-CCP é uma característica marcante da AR, no entanto, acredita-se que a contribuição dos linfócitos B na patogênese da doença vai além da produção de anticorpos. São também descritas como funções dos linfócitos B: i) a apresentação de antígenos a linfócitos T autorreativos; ii) a expressão de

moléculas de adesão e moléculas co-estimulatórias, as quais promovem ativação de linfócitos T; iii) a síntese de quimiocinas que promovem a infiltração de leucócitos na articulação; iv) a produção de citocinas como interleucina (IL)-6, Fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), entre outras; v) a produção de fatores que iniciam e sustentam a angiogênese; vi) a manutenção de resposta de memória a autoantígenos (FIRESTEIN; MCINNES, 2017; MCINNES; SCHETT, 2011; SILVERMAN; CARSON, 2003).

A ação dos linfócitos B em conjunto com linfócitos T autorreativos contribui para o aparecimento de sinovite. O acúmulo dos linfócitos na articulação sinovial é primariamente um reflexo do influxo de células para o local de inflamação, o qual é propiciado pelo aumento do número de vasos sanguíneos, aumento da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas. Na AR observa-se uma predominância de linfócitos T com polaridade Th1 (do inglês, *T helper 1*), provavelmente mantida pela expressão de citocinas como IL-18, IL-12 e IL-15, na membrana sinovial. Ainda, os próprios linfócitos Th1 estão envolvidos na produção de citocinas pró-inflamatórias, como interferon (INF)- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e metaloproteinases, através de interações com outras células da membrana sinovial como macrófagos e fibroblastos, o que contribui diretamente para o processo de cronificação da inflamação e indução do processo de lesão tecidual (Figura 5) (MCINNES; LEUNG; LIEW, 2000; SHI; LJUNGGREN; SARVETNICK, 2001).

Recentemente, a investigação do papel de linfócitos Th17 (do inglês, *T helper 17*) e células T regulatórias (Tregs) na patogênese da AR vem ganhando destaque na literatura. Enquanto os linfócitos Th17 presentes na articulação sinovial são responsáveis pela produção das citocinas IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e TNF- $\alpha$ , as células Tregs, apresentam limitações na sua capacidade funcional, o qual parece ser mediado pela ação de TNF- $\alpha$ . Acredita-se ainda que uma ação sinérgica entre IL-17A e TNF- $\alpha$  promove a ativação de fibroblastos, condrócitos e osteoclastos, contribuindo diretamente para a degradação da articulação (Figura 5) (FIRESTEIN; MCINNES, 2017; MCINNES; SCHETT, 2011; SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016).

Dentre as citocinas, o TNF- $\alpha$  exerce papel central na patogênese da AR, sendo produzido principalmente por macrófagos e em menor escala por linfócitos T, células B e fibroblastos sinoviais. Seus efeitos inflamatórios incluem a ativação de osteoclastos, indução da expressão de moléculas de adesão endoteliais, supressão de atividade de células Tregs e secreção de citocinas e quimiocinas (KIM; MOUDGIL, 2017; SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016). Devido ao seu importante papel no processo inflamatório

na AR, diversos fármacos bloqueadores de TNF- $\alpha$  (adalimumabe, certolizumabe, etanercept, golimumabe, infliximabe) são utilizados no tratamento da doença, representando um dos maiores avanços no controle da AR nos últimos anos (DA MOTA et al., 2012; MA; XU, 2012).

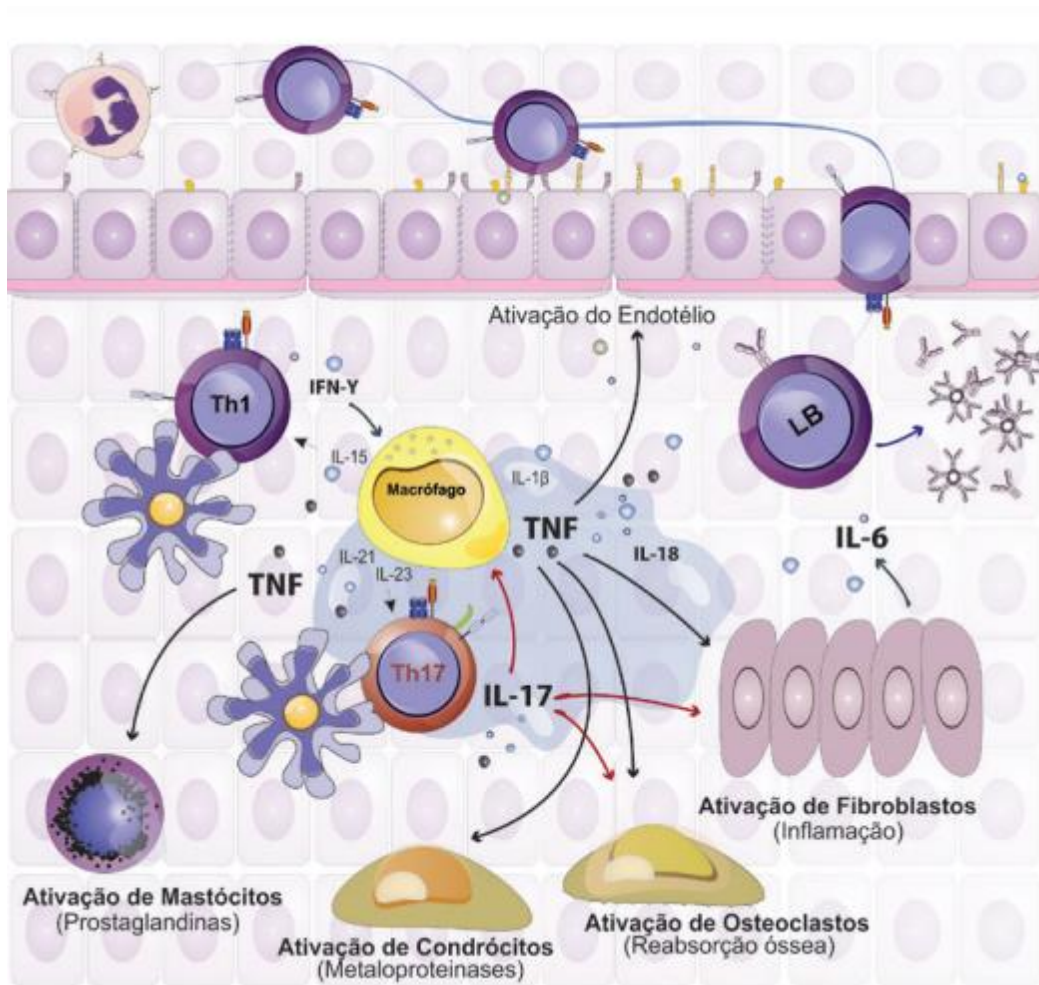


Figura 5. Representação esquemática do mecanismo imunopatológico envolvido na AR. Células do sistema imune infiltram a articulação sinovial. Linfócitos B participam da produção de autoanticorpos; Linfócitos Th1 e Th17 influenciam no processo inflamatório através da interação com outras células do sistema imune, como macrófagos, e pela síntese de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-17). Essas citocinas pró-inflamatórias, por sua vez, atuam na ativação do endotélio, ativação de fibroblastos a produzirem IL-6, ativação de osteoclastos, condrócitos e mastócitos. Adaptado de MORAIS et al., 2014.

A IL-6 também é uma citocina que apresenta importante papel na patogênese da doença. É uma das mais abundantes em líquido sinovial de indivíduos com AR e suas funções estão relacionadas à ativação de leucócitos, ativação de osteoclastos, diferenciação de linfócitos B e produção de anticorpos (KIM; MOUDGIL, 2017;



SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016). Assim como o TNF- $\alpha$ , o bloqueio de IL-6 é utilizado como estratégia terapêutica no manejo da AR (DA MOTA et al., 2012). Cabe ainda mencionar que outras citocinas como INF- $\gamma$ , IL-1b, IL-2 e IL-17 também apresentam funções importantes na indução e perpetuação do processo inflamatório da AR (KIM; MOUDGIL, 2017).

Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento da AR, a persistência da doença ao longo de anos aliada à inflamação crônica que leva à incapacitação física do paciente, ainda são os maiores desafios dessa doença. Além disso, a interação entre múltiplos fatores como diferentes células do sistema imunológico, células sinoviais, autoanticorpos e citocinas presentes na articulação sinovial, tornam complexa a compreensão de seu mecanismo fisiológico.

### **As células *Natural Killer* e os receptores NKG2**

As células *Natural Killer* (NK) foram identificadas em 1975 como linfócitos atuantes na resposta imune inata. Essas células encontram-se amplamente distribuídas pelo corpo e correspondem a 5 - 10% dos linfócitos presentes no sangue periférico. Além da sua presença em tecidos linfoides secundários (linfonodos, baço), sob condições normais, também podem ser encontradas em órgãos periféricos como pulmões, útero, pele e fígado (BJÖRKSTRÖM; LJUNGGREN; MICHAËLSSON, 2016; CALIGIURI, 2008).

O papel dessas células está primariamente relacionado ao reconhecimento da presença ou não de moléculas de MHC de classe I na superfície de células periféricas. A teoria do *missing-self* (ausência do próprio) propõe que células T e células NK representam mecanismos complementares de defesa do sistema imune. Enquanto as células T reconhecem e são ativadas por complexos de peptídeos e moléculas de MHC, as células NK são responsáveis pela morte de células-alvo na ausência dessas proteínas na superfície celular (BJÖRKSTRÖM; LJUNGGREN; MICHAËLSSON, 2016; MIDDLETON; CURRAN; MAXWELL, 2002). Essa ação permite a eliminação de células tumorais e células infectadas por vírus, uma vez que nessas situações, observa-se a supressão da expressão de MHC classe I na superfície celular como forma de escape do reconhecimento pelo sistema imunológico. A lise da célula-alvo ocorre através da ação citotóxica da célula NK, a qual engloba a liberação de grânulos citoplasmáticos como granzima e perforina (MIDDLETON; CURRAN; MAXWELL, 2002).

Atualmente, sabe-se que as funções da célula NK são muito mais amplas do que um simples papel citotóxico mediado por ausência da expressão do MHC, incluindo uma extensa participação no processo de gestação (permitindo a tolerância ao não próprio), ação citotóxica sobre células em um contexto de estresse celular e importante atuação na produção de citocinas e quimiocinas, as quais atuam na modulação da resposta imune adaptativa. As células NK, quando estimuladas por INF- $\alpha$ , IL-12, IL-15 e IL-18, promovem a síntese e liberação de citocinas e quimiocinas incluindo INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (BJÖRKSTRÖM; LJUNGGREN; MICHAËLSSON, 2016).

Fenotipicamente essas células caracterizam-se pela ausência da expressão de CD3 e pela presença da molécula CD56 na superfície celular. Classicamente, as células NK presentes no sangue periférico em humanos são classificadas em dois subgrupos distintos, baseados na intensidade de expressão da molécula CD56: CD56<sup>bright</sup> e CD56<sup>dim</sup>. As células NK CD56<sup>bright</sup> apresentam pouca ou nenhuma expressão de CD16, KIR (do inglês, *Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors*) e CD57. Além disso, apresentam elevada expressão de NKG2A/CD94, NKp30, NKp46 e receptores de citocinas. Por outro lado, as células NK CD56<sup>dim</sup> caracterizam-se pela elevada expressão de CD16, KIR, CD57, perforina e baixos níveis de NKG2A/CD94 (CALIGIURI, 2008). Existem evidências indicando que células CD56<sup>bright</sup> são precursoras de células CD56<sup>dim</sup> uma vez que, células CD56<sup>bright</sup> quando estimuladas com IL-2 *in vitro* podem adquirir a expressão de CD16 e KIR e em paralelo, modular negativamente a expressão de CD127 e CD117. Mudanças fenotípicas alteram a funcionalidade celular, pois células CD56<sup>dim</sup> mais diferenciadas perdem gradualmente a sua capacidade de responder a citocinas como IL-12 e IL-15, contudo retém e potencializam suas propriedades citotóxicas (CHAN et al., 2007).

As funções das células NK são reguladas através do balanço na expressão de diversos receptores na superfície celular, os quais se subdividem em ativadores e inibitórios. A interação desses receptores de superfície com moléculas específicas (conhecidas por ligantes) em células-alvo permite o estabelecimento de sinapses imunológicas ativadoras - as quais estão envolvidas na ativação da citotoxicidade e produção de citocinas - ou inibitórias, relacionadas à supressão dessas funções (BORREGO et al., 2006; VIVIER et al., 2008).

Existem duas grandes classes de receptores de células NK: a superfamília dos receptores homólogos às lectinas tipo C e os receptores NK com domínios semelhantes à

Ig. Fazem parte da superfamília de receptores de NK homólogos às lectinas tipo C, a família de receptores Ly49 (expressos somente em camundongos) e os receptores NKG2 (expressos em camundongos e humanos). Dentro do grupo de receptores com domínios semelhantes a Ig destacam-se a família de receptores KIR e os receptores naturais de citotoxicidade (NCR do inglês, *natural cytotoxicity receptor*) como NKp46, NKp80 e NKp30 (BARTEL; BAUER; STEINLE, 2013; PEGRAM et al., 2011).

Os receptores NKG2 também conhecidos por KLR (do inglês, *killer cell lectin-like receptor*), são produzidos a partir de cinco genes - *KLRC1 (NKG2A)*, *KLRC2 (NKG2C)*, *KLRC3 (NKG2E)*, *KLRC4 (NKG2F)*, *KLRK1 (NKG2D)* - os quais estão localizados no cromossomo 12p13.2 (Figura 6). Os receptores NKG2A, NKG2C, NKG2E são expressos na superfície celular ligados covalentemente à molécula CD94, enquanto que o receptor NKG2D é expresso na forma de homodímero na superfície celular (IWASZKO; BOGUNIA-KUBIK, 2011; MIDDLETON; CURRAN; MAXWELL, 2002).

Recentemente, foi descrito NKG2H, produto de um *splicing* alternativo do pré-RNA mensageiro (mRNA) do gene de *NKG2E*, no entanto, seu papel ainda não está bem elucidado. O receptor NKG2F encontra-se expresso somente em compartimentos intracelulares. Além disso, apresenta domínio extracelular menor comparado aos demais receptores da família NKG2 devido a adição de dois nucleotídeos em sua sequência gênica, os quais levam à formação de um códon de término prematuro (BORREGO et al., 2006).

É importante destacar que os receptores NKG2 são abundantemente expressos em células NK, contudo também são encontrados em subpopulações de linfócitos T- CD8+ e T-CD4+. O entendimento sobre o papel dessas moléculas na resposta imunológica depende da compreensão de suas diferenças estruturais, das diferenças de sua expressão entre distintos subtipos celulares bem como do potencial de interação com seus ligantes específicos (SNYDER; WEYAND; GORONZY, 2004).

Enquanto NKG2C/D/E são receptores ativadores, NKG2A atua como um receptor inibitório, ou seja, regulando negativamente as ações de citotoxicidade e de produção de citocinas a partir da interação com seu ligante HLA-E. De forma semelhante, NKG2C também interage com a molécula HLA-E, apesar da afinidade dessa ligação ser dez vezes mais fraca quando comparada à interação entre NKG2A e HLA-E (BORREGO et al., 2006). Os ligantes de NKG2D incluem as proteínas relacionadas ao MHC de classe I A e

B (MICA e MICB - do inglês, *MHC class I chain-related protein A and B*), além de proteínas ligadoras UL16 - ULBP1-4 (do inglês, *UL16 binding protein*). O aumento da expressão dessas moléculas está principalmente relacionado a situações de estresse celular, transformação maligna das células ou infecções por microrganismos (PEGRAM et al., 2011).

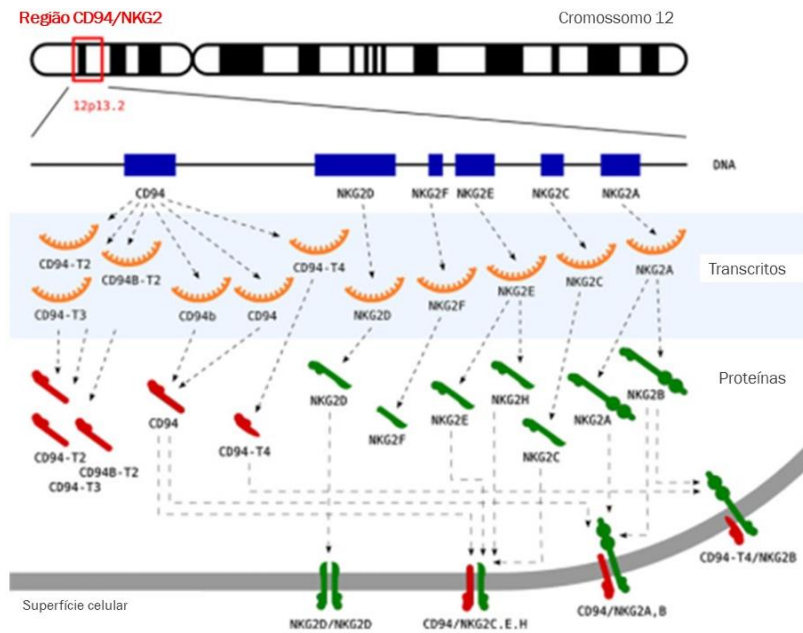


Figura 6. Representação dos genes CD94/NKG2 e seus produtos. O gene de *CD94* é capaz de produzir, através de *splicing* alternativo, seis transcritos diferentes. Das sete proteínas descritas como membros da família NKG2, somente o NKG2D e NKG2F não formam heterodímeros com a molécula de CD94. As moléculas inibitórias NKG2A e NKG2B são variantes de *splicing* alternativo do mesmo transcrito do gene *NKG2A*, enquanto que NKG2E e NKG2H são variantes de *splicing* alternativo do mesmo transcrito de *NKG2E*. Adaptado de IWASZKO; BOGUNIA-KUBIK, 2011.

A sinalização induzida pela ação de receptores NKG2 ativadores como NKG2C e NKG2E ocorre através da interação com a proteína adaptadora 12 (DAP12) a qual induz a sinalização através do motivo ITAM (do inglês, *immunoreceptor tyrosine-based activating motif*). O receptor NKG2D, por sua vez, encontra-se associado à proteína adaptadora DAP10, promovendo a sinalização via PI3K (do inglês, *phosphatidylinositol-3 kinase*) (PEGRAM et al., 2011). Finalmente, o receptor inibitório NKG2A induz sinalização via ITIM (do inglês, *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) localizado na porção citoplasmática desses receptores (BORREGO et al., 2006;

MIDDLETON; CURRAN; MAXWELL, 2002). A interação dos receptores NKG2 com seus ligantes promove, por exemplo, a fosforilação do motivo ITIM e ITAM a qual desencadeia a ativação de uma cascata de quinases que resulta na liberação de grânulos citotóxicos pela célula NK e/ou na transcrição de genes de citocinas e quimiocinas (PEGRAM et al., 2011).

Geneticamente, os receptores NKG2 apresentam menor variabilidade quando comparados com outros receptores de NK, como, por exemplo, os receptores KIR. *NKG2A* é formado por sete éxons, incluindo o éxon inicial não codificante (SEO et al., 2007). Diferentes polimorfismos já foram descritos para *NKG2A*, apesar da maioria dos estudos não demonstrar associação dessas variantes com o desenvolvimento de doenças (HIZEM et al., 2014; MA et al., 2010; MARIASELVAM et al., 2016; PARK; PARK; SONG, 2008). Dentre esses polimorfismos estão incluídos c.-4258C>G localizado na região promotora do gene; rs2734414 localizado na região 3' não traduzida (3'UTR do inglês, 3' - *untranslated region*) do gene e duas variantes (rs7301582 e rs2734440) localizadas em regiões intrônicas (MA et al., 2010; SEO et al., 2007).

Dentre as variantes de *NKG2*, o polimorfismo rs2255336 de *NKG2D* é o mais estudado. Essa variante genética caracteriza-se por uma transição de base (guanina por adenina) que acarreta na substituição do aminoácido alanina por uma treonina na posição 72 da sequência de aminoácidos da proteína. Estudos sugerem que a modificação do aminoácido não altera a expressão do receptor na superfície celular, porém pode potencialmente interferir na afinidade de ligação de NKG2D ao seu adaptador DAP10 influenciando a transmissão do sinal de ativação celular (SHUM et al., 2002). O genótipo GG (Ala/Ala) de rs2255336 *NKG2D* foi associado a susceptibilidade a lúpus eritematoso sistêmico (LES) em uma população alemã (KABALAK et al., 2010), enquanto que, em outro estudo, o alelo Thr apresentou efeito protetor ao desenvolvimento do LES (PIOTROWSKI; LIANERI, 2012). O efeito protetor do alelo Thr também foi evidenciado com relação ao desenvolvimento do câncer (ROSZAK; LIANERI; JAGODZIŃSKI, 2012), apesar de resultados opostos já terem sido descritos (MELUM et al., 2008).

Hayashi e colaboradores identificaram que oito polimorfismos de *NKG2* constituíam dois blocos haplotípicos (nomeados hb-1 e hb-2, respectivamente) os quais estão diretamente associados a atividade citotóxica das células NK. Dentre esses oito polimorfismos, sete estão no gene *NKG2D* (rs1049174, rs2255336, rs2617160, rs2246809, rs2617169, rs2617170, rs2617171) e um na região promotora do gene *NKG2A*

(rs1983526) (Figura 7). Cada bloco haplotípico é formado por dois alelos: hb-1 LNK1 e HNK1; e hb-2 LNK2 HNK2. Os alelos LNK1 e LNK2 estão associados a uma baixa atividade citotóxica de células NK enquanto os alelos HNK1 e HNK2 determinam alta atividade citotóxica de NK (HAYASHI et al., 2006). Dentre os oito polimorfismos identificados, a variante rs1049174 parece apresentar papel determinante na regulação da atividade das células NK, pois este polimorfismo está localizado em uma região que contém um potencial sítio de ligação de microRNAs como miR-1245. A ligação de miR-1245 ocorre com maior afinidade nos alelos haplotípicos de LNK do que nos alelos HKN (ESPINOZA et al., 2016; FURUE et al., 2008).

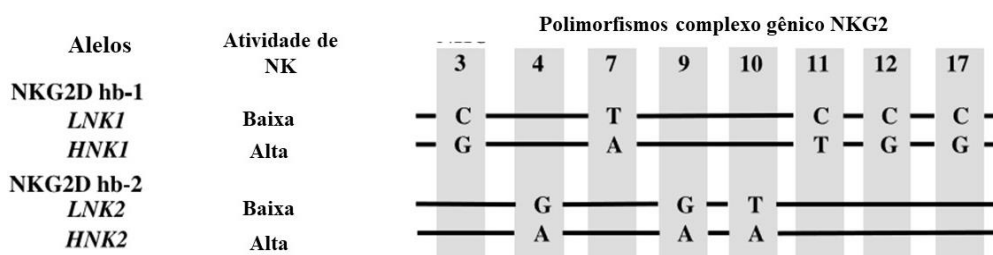


Figura 7. Representação dos blocos haplotípicos hb-1 e hb-2 de NKG2D/NKG2A. Os polimorfismos do complexo gênico (*NKC/NKG2*) estão representados por números. NKC3: rs1049174; NKC4: rs2255336; NKC7: rs2617160; NKC9: rs2246809; NKC10: rs2617169; NKC11: rs2617170; NKC12: rs2617171 (*NKG2D*) e NKC17: rs1983526 (*NKG2A*). Cada bloco haplotípico dá origem a dois alelos os quais estão vinculados a baixa e alta atividade das células NK. Adaptado de HAYASHI et al., 2006.

Em 2003, Hikami e colaboradores genotiparam uma amostra da população Japonesa encontrando uma frequência de homozigotos para a variante de deleção de *NKG2C* igual a 4,3% (HIKAMI et al., 2003). Essa deleção contempla uma região de aproximadamente 16kb que engloba o gene *NKG2C* e já foi previamente associada com diferentes níveis de expressão do respectivo receptor na superfície de células NK (MUNTASELL et al., 2016; NOYOLA et al., 2012; THOMAS et al., 2012). Os pontos de quebra desta deleção foram determinados a partir da comparação com sequências gênicas de *NKG2A* e *NKG2E* (MIYASHITA et al., 2004).

A presença da deleção de *NKG2C* em diversas populações (LI et al., 2015; MIYASHITA et al., 2004; MORARU et al., 2012; THOMAS et al., 2012) e a ausência de influência dessa deleção na susceptibilidade à diferentes doenças como infecções virais, câncer e doenças autoimunes (LI et al., 2015; MIYASHITA et al., 2004; MORARU et al., 2012; NOYOLA et al., 2012; VILCHEZ et al., 2013) corroboram a

hipótese de que essa molécula não é essencial para a sobrevivência do indivíduo e que sua ausência pode ser compensada pela presença de outros receptores ativadores (GONCALVES et al., 2016).

Considerando a escassez de dados disponíveis na literatura sobre a influência desses polimorfismos na expressão de seus respectivos receptores e, conseqüentemente, no desenvolvimento de doenças, torna-se indispensável que mais estudos sejam conduzidos nessa área. A investigação do papel dessas moléculas em doenças autoimunes como a AR, destaca-se como um tópico de interesse, pois as células NK assumem papel imunoregulador importante na patogênese AR, o qual é comandado pelos sinais ativadores e inibitórios enviados pelos receptores NKG2 (SHEGARFI; NADDAFI; MIRSHAFIEY, 2012).

### **As células *Natural Killer* e os receptores NKG2 na AR**

O papel das células NK na AR não está completamente elucidado. Alguns estudos sugerem que essas células apresentam um papel importante na indução e manutenção da inflamação, uma vez que são capazes de sintetizar e liberar diferentes citocinas inflamatórias. Por outro lado, acredita-se que o potencial citotóxico dessas células pode contribuir para a eliminação de linfócitos T e B autorreativos, atuando assim, de forma protetora no desenvolvimento da autoimunidade (AHERN; BRENNAN, 2011; SHEGARFI; NADDAFI; MIRSHAFIEY, 2012).

Diversos estudos descrevem o acúmulo de células NK CD56<sup>brigh</sup> CD94/NKG2A<sup>+</sup> em articulações inflamadas de pacientes com AR. Contudo, essa característica não é uma exclusividade da AR, uma vez que essas células foram encontradas em grande quantidade em diferentes sítios inflamatórios como fluido pleural e fluido peritoneal de indivíduos com outras condições clínicas (DALBETH et al., 2004; DALBETH; CALLAN, 2002; PRIDGEON et al., 2003). Segundo Dalbeth e Callan (2002), análises comparativas entre o sangue periférico e o líquido sinovial de indivíduos com artrite inflamatória indicam que não há uma diferença no percentual de células NK entre esses dois compartimentos biológicos do mesmo paciente, contudo, observa-se uma diferença significativa no fenótipo dessas células NK. Células NK do líquido sinovial expressam grande quantidade de CD94 (93%) e NKG2A (88%) em comparação às células NK do sangue periférico (expressão de 56% de CD94 e 48% de NKG2A) dos mesmos pacientes. É importante

ressaltar que esses resultados não foram exclusivos para pacientes com AR, mas estendem-se também para indivíduos com artrite psoriática e pacientes com trauma articular. Um estudo posterior também não encontrou diferenças no número de células NK entre sangue periférico e líquido sinovial, mas identificou o mesmo perfil de células NK NKG2A+ em articulações inflamadas de pacientes com AR, além de uma elevada expressão de NKG2D em sangue periférico e líquido sinovial (97% vs. 93% respectivamente) desses pacientes (DE MATOS et al., 2007).

Sabe-se que a expressão de receptores NKG2 não se restringe às células NK. No tecido sinovial e no sangue periférico de pacientes com AR identificou-se a expressão de NKG2D em células T CD4+ CD28-. Diferentemente das demais células T auxiliares, as células T CD4+ CD28- produzem grande quantidade de INF- $\gamma$  e apresentam potencial citotóxico, indicando um papel semelhante ao das células NK (YEN et al., 2001). Sugere-se ainda que a expressão de NKG2D em células T-CD4+ pode ser induzida por altos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-15 (GROH et al., 2003; SNYDER; WEYAND; GORONZY, 2004). A expressão de NKG2A/CD94 em linfócitos T foi sugerida como possível marcador de sangue periférico para diferenciação do estágio clínico de pacientes com AR sob tratamento de anti-TNF, pois pacientes em estágio de remissão apresentaram maior expressão de CD161, CD57 e NKG2A/CD94 em células T quando comparados a pacientes com AR ativa. Além disso, uma correlação inversa entre a expressão de NKG2A em linfócitos T e DAS28 foi observada (WALSH et al., 2011).

Conforme exposto anteriormente, células CD56<sup>bright</sup> apresentam grande potencial na produção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , as quais são capazes de induzir respostas Th1 e aumentar a expressão de moléculas de MHC classe I em várias células apresentadoras de antígenos (AGGARWAL; SHARMA; BHATNAGAR, 2014; SHEGARFI; NADDAFI; MIRSHAFIEY, 2012).

A produção dessas citocinas ocorre principalmente quando células NK encontram-se estimuladas por IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18 (DALBETH et al., 2004; SHEGARFI; NADDAFI; MIRSHAFIEY, 2012). Estudos *in vitro* demonstram que a presença dessas citocinas em conjunto com células NK CD56<sup>bright</sup> estimula a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos, contribuindo dessa forma, para a exacerbação do processo inflamatório (DALBETH et al., 2004). Também sugere-se que as células NK presente na sinóvia estimulam a diferenciação de macrófagos em células dendríticas e podem levar a um aumento de proliferação de fibroblastos sinoviais através da secreção de IL-22



(POPKO; GÓRSKA, 2015; REN et al., 2011). A produção de INF- $\gamma$  que é induzida por IL-12 derivada de célula dendrítica, pode atuar como um fator sinérgico da regulação da maturação de células dendríticas e aumentar a expressão de MICA e MICB que, por sua vez, ativarão células NK a partir da interação com receptores NKG2D (SHEGARFI; NADDAFI; MIRSHAFIEY, 2012).

Todas essas evidências apontam para um importante papel das células NK na perpetuação do processo inflamatório na AR, contudo alguns estudos propõem um papel protetor dessas células no desenvolvimento da doença. Em um estudo de Aggarwal e colaboradores (2014), a depleção de células NK de sangue periférico foi associada a pacientes com AR e maior severidade da doença. De forma semelhante, outro estudo observou uma redução no número de células NK em sangue periférico de pacientes com artralgia e AR soropositiva quando comparado à indivíduos saudáveis (CHALAN et al., 2016). Conigliaro e colaboradores, (2014) descreveram uma redução basal no número de células NK, mas não percentual, em pacientes com AR e pacientes com artrite psoriática. Após tratamento com bloqueador de TNF- $\alpha$ , observou-se um aumento significativo no número dessas células em sangue periférico de ambos os grupos (CONIGLIARO et al., 2014).

A diminuição de células NK em sangue periférico de pacientes com AR está diretamente relacionada ao comprometimento da atividade citolítica dessas células, o que pode ocasionar a persistência de linfócitos T autorreativos e contribuir para a produção de citocinas (RICHTER et al., 2010; SHIBATOMI et al., 2001). Aramaki e colaboradores identificaram um menor potencial lítico das células NK de sangue periférico de pacientes com AR quando comparado a controles. Ainda, o percentual de células NK que expressavam NKG2D também foi menor nos pacientes com AR. Esses resultados foram correlacionados positivamente com a presença de IL-6 sugerindo que a presença desta citocina poderia estar associada à diminuição do número de células NK, que por sua vez, levaria a uma diminuição da atividade NK em pacientes com AR (ARAMAKI et al., 2009). Uma das explicações para a redução no número de células NK na periferia de pacientes com AR pode estar relacionada ao aumento da apoptose nesse subtipo celular, mediado por uma elevada atividade de caspase-3 (AGGARWAL; SHARMA; BHATNAGAR, 2014; CHALAN et al., 2016).

Análises mais detalhadas de apoptose em células NK revelam que os diferentes subgrupos dessas células apresentam susceptibilidade diferente ao processo de apoptose.

A expressão de CD94/NKG2A foi relacionada a uma diminuição nas taxas de apoptose em células NK e linfócitos T-CD8+, sugerindo um importante papel desses receptores na proteção contra o processo apoptótico (GUNTURI et al., 2003). Esses resultados poderiam explicar, pelo menos em parte, o acúmulo de células NK CD56<sup>bright</sup> observado no líquido sinovial de pacientes com AR e corroboram o aumento de apoptose observado em células NK CD56<sup>dim</sup> periféricas.

Considerando todos esses estudos, fica evidente a participação das células NK na patogênese da AR. Por um lado, as células NK, especialmente o subgrupo de células CD56<sup>bright</sup> exercem importante contribuição para processos inflamatórios, incluindo os eventos relacionados principalmente à exacerbação da AR. O acúmulo dessas células na articulação sinovial pode ser reflexo de recrutamento preferencial, diferenciação local, proliferação local ou ainda sobrevivência seletiva. Por outro lado, esses mesmos fatores podem ser responsáveis pela diminuição do número de células CD56<sup>dim</sup> periféricas e ainda contribuir para o menor potencial citotóxico exercido por essas células (DALBETH et al., 2004).

## **Polimorfismos de NKG2 na AR**

O primeiro estudo que investigou o potencial de variantes em genes *NKG2* na AR foi realizado por Hikami et al., (2003). Neste trabalho, foram investigados polimorfismos nos genes *NKG2A*, *NKG2C* e *CD94* em uma amostra de indivíduos Japoneses. Para *NKG2A*, onze novas variantes genéticas foram descritas, sendo apenas uma delas localizada na região codificante (c.238T>A; Cis80Ser). Duas novas variantes foram identificadas em *NKG2C* (c.287-29T>A e c.704\_705GG>AA) e uma variante em *CD94* (c.-134A>T) na região 5' não traduzida. Um dos resultados mais significativos deste trabalho refere-se à identificação da deleção de *NKG2C* como uma variante comum na população. Até o momento, no entanto, a deleção de *NKG2C* não foi associada ao desenvolvimento de AR ou de LES (HIKAMI et al., 2003; MIYASHITA et al., 2004).

Com relação a *NKG2A*, apenas um estudo identificou um efeito protetor do genótipo AA do rs2734440 no desenvolvimento de AR, em uma população Coreana. Nesse mesmo estudo, os genótipos Ser/Ser de *NKG2C* rs1141715 e Thr/Thr de *NKG2D* rs2255336 foram associados ao aumento do risco para AR, enquanto que as variantes de

*NKG2D* rs1049172 e rs1049174 não apresentaram qualquer associação significativa (PARK; PARK; SONG, 2008).

O único trabalho que contempla a análise de variantes *NKG2* em um grupo de pacientes caucasoides com AR foi conduzido por Iwasko et al., 2016. Neste estudo, apenas variantes de *CD94* (rs2302489) e *NKG2A* (rs7301582, rs2734440, 2734414) foram incluídas. Os resultados evidenciam um papel do polimorfismo de *CD94* na susceptibilidade à AR e resposta ao tratamento com anti-TNF, uma vez que a frequência do genótipo AA estava significativamente diminuída em pacientes. Além disso, pacientes com o genótipo AA apresentaram melhor resposta ao tratamento em comparação a pacientes com o genótipo TT. O desfecho relacionado ao tratamento com anti-TNF também parece estar associado ao polimorfismo rs2734440 de *NKG2A*, pois a frequência do genótipo AA foi significativamente maior entre os pacientes não respondedores ao tratamento quando comparado a pacientes respondedores (IWASZKO et al., 2016).

A escassez de trabalhos que contemplam o tema em questão limita o entendimento do papel das variantes de *NKG2* na susceptibilidade à AR. Ainda, a maioria dos estudos disponíveis na literatura foi conduzida com indivíduos de origem asiática, não permitindo que as associações encontradas sejam extrapoladas para populações com origens étnicas distintas.

## **O processo de apoptose**

A apoptose é um reconhecido e distinto processo de morte celular programada que ocorre naturalmente durante o desenvolvimento das células do corpo humano e representa um importante mecanismo de manutenção do equilíbrio das populações celulares nos tecidos periféricos (ELMORE, 2007). Esse processo é responsável pela eliminação de células potencialmente danosas ao organismo como, por exemplo, células que apresentam alterações no controle do ciclo celular (FESIK, 2005).

Tanto estímulos fisiológicos quanto patológicos são capazes de desencadear o processo de apoptose, no entanto, sabe-se que as células apresentam diferenças na susceptibilidade de resposta a esses estímulos. Durante o processo de apoptose, a célula sofre diversas alterações morfológicas, como a diminuição de seu tamanho (devido à compactação de organelas e aumento da densidade do citoplasma), o condensamento da cromatina e a formação de corpos apoptóticos (vesículas compostas por citoplasmas com

organelas altamente compactadas). Os corpos apoptóticos são fagocitados e degradados em uma reação não inflamatória, pois células em apoptose não liberam seu conteúdo citoplasmático no meio extracelular (ELMORE, 2007).

Classicamente, a literatura reporta a existência de duas vias que desencadeiam o processo de apoptose: a via extrínseca e a via intrínseca. A primeira envolve a ativação de receptores transmembrana de morte celular. Esses receptores pertencem à superfamília de receptores de TNF, os quais apresentam um domínio citoplasmático composto por 80 aminoácidos conhecido como domínio de morte (do inglês, *death domain*). Esse domínio é responsável pela transdução do sinal originário na membrana plasmática para o interior da célula. As moléculas Fas (CD95), TNFR (do inglês, *TNF receptor 1*), DR4 (do inglês, *death receptor 4*) ou DR5 (do inglês, *death receptor 5*) são exemplos desses receptores. Por outro lado, *Fas ligand* (CD95L), TNF, *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) são os respectivos ligantes dos receptores de morte celular (FESIK, 2005; IGNEY; KRAMMER, 2002). Neste capítulo, o modelo Fas/FasL será utilizado como exemplo de ativação de via extrínseca e suas características e funções serão detalhadas a seguir.

A interação entre Fas e FasL resulta na ligação da proteína adaptadora FADD (do inglês, *Fas associated death domain*). Em seguida, FADD se associa a pró-caspase 8 e pró-caspase 10 através da dimerização com o domínio de morte formando o complexo DISC (do inglês, *death-inducing signaling complex*). A formação desse complexo resulta na ativação auto-catalítica de pró-caspase 8. Uma vez ativada, a caspase-8 induz o processo auto-catalítico das caspases efetoras 3, 6 e 7, resultando na sua liberação no citoplasma. Este processo pode ser bloqueado e é reversível em seus estágios iniciais. A proteína c-FLIP (do inglês, *FLICE-like inhibitory protein*) é capaz de se ligar a FADD e caspase-8 inibindo a ativação da via das caspases e consequentemente a apoptose celular (Figura 8) (ASHKENAZI, 2008; ELMORE, 2007).

A ativação da via intrínseca envolve uma série de estímulos intracelulares positivos e negativos que agem diretamente na mitocôndria da célula-alvo. A ausência de fatores de crescimento, hormônios e citocinas são exemplos de sinais negativos que regulam essa via, pois a ausência desses componentes resulta na perda da capacidade de supressão do processo de apoptose. Por outro lado, a exposição à radiação, a toxinas, à hipóxia, a infecções virais e a presença de radicais livres atuam como sinais positivos na indução de morte celular. Quando presentes, independentemente do tipo, esses estímulos

promovem uma alteração na permeabilidade da membrana interna da mitocôndria que resulta na formação de um poro, levando, conseqüentemente, a perda do potencial transmembrana e a liberação de proteínas no citoplasma da célula. A liberação de citocromo c, Smac/DIABLO (do inglês, *second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI*) desencadeiam a ativação da via das caspases. O citocromo c se liga e ativa as moléculas de Apaf-1 (do inglês, *apoptotic protease-activating factor 1*) e pró-caspase 9 formando um complexo conhecido como apoptossomo. Nesse complexo, a caspase-9 torna-se ativa. As proteínas Smac/DIABLO promovem a apoptose pela inibição da proteína IAP (do inglês, *inhibitors of apoptosis proteins*) (ELMORE, 2007; FESIK, 2005; IGNEY; KRAMMER, 2002).

Ambas as vias culminam na ativação da cascata de caspases efetoras, considerada a fase final da via de apoptose. Dentre as diversas proteínas envolvidas nessa fase, destacam-se a caspase-3, a caspase-6 e a caspase-7 as quais atuam como “executoras” do processo. A caspase-3 (induzida pelas caspases iniciadoras 8, 9 e 10) é considerada uma das principais proteínas apoptóticas, pois quando ativada, desencadeia o processo de degradação do DNA cromossomal, promove o condesamento da cromatina, induz a reorganização do citoesqueleto celular e estimula a formação dos corpos apoptóticos (ELMORE, 2007; IGNEY; KRAMMER, 2002).

Apesar de apresentarem mecanismos de ativação distintos, as vias de apoptose são capazes de agir sinergicamente, o que resulta em amplificação do sinal, através da interação entre proteínas presentes em cada uma das vias. A ativação de caspase-8 pela via extrínseca pelo receptor Fas pode promover a clivagem de BID (proteína proapoptótica de domínio BH3-only agonista da morte celular). Essa molécula, por sua vez, após clivada, se liga nas proteínas BAX e BAK presentes na membrana da mitocôndria, ocasionando o aumento da permeabilidade mitocondrial e a liberação de citocromo c e Smac. Esse processo resulta na ativação de caspase 9 e caspases subsequentes (ASHKENAZI et al., 2017; FESIK, 2005).

A apoptose destaca-se como um importante processo envolvido em distintos eventos do corpo humano, como por exemplo, no desenvolvimento embrionário, seleção de células T e B e eliminação de linfócitos autorreativos na periferia. Essa miríade de eventos é finamente regulada por uma série de moléculas que atuam em diferentes níveis. A perda da regulação fina desse processo parece estar diretamente relacionada ao

desenvolvimento e perpetuação de condições autoimunes como a AR (FAVALORO et al., 2012).

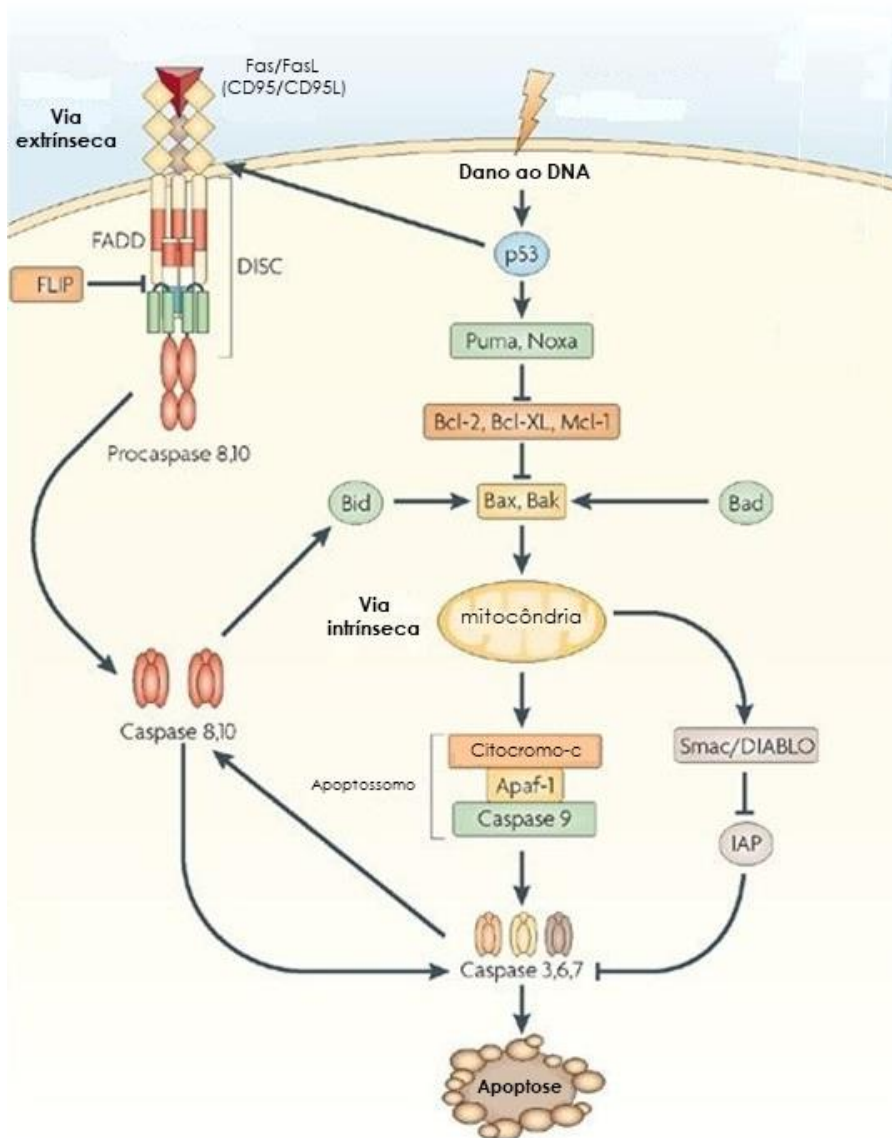


Figura 8. Representação esquemática das vias extrínseca e intrínseca de apoptose. A via intrínseca inicia a partir de um dano à célula que ativa a proteína supressora de tumor p53, a qual estimula positivamente as moléculas Puma (do inglês, *p53 upregulated modulator of apoptosis*) e Noxa que, por sua vez, ativam Bax e Bak. As alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial resultam no efluxo de citocromo c para o citoplasma, o qual se liga a Apaf-1, recrutando caspase-9. A interação entre citocromo c, Apaf-1 e caspase-9 resulta na formação de um complexo de sinalização conhecido por apoptossomo. A caspase-9 ativada promove a clivagem e conseqüentemente ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7. As proteínas mitocondriais Smac/DIABLO participam da ativação do processo de apoptose através da inibição de fatores como IAP. A via extrínseca de apoptose inicia a partir da interação entre um receptor de membrana e seu respectivo ligante na membrana celular. A interação entre essas moléculas desencadeia o recrutamento de FADD e pró-caspases 8 e 10, resultando na formação do complexo DISC. A molécula de FLIP é capaz de

inibir a formação de DISC através da sua interação com FADD. A partir da formação desse complexo, caspases-8 e -10 se tornam ativas, sendo liberadas no citoplasma onde iniciam a ativação das caspases efetoras 3, 6 e 7, resultando no evento de apoptose. Adaptado de ASHKENAZI, 2008.

## **A apoptose na AR**

Uma característica comum às doenças autoimunes é a perda de tolerância a antígenos próprios e a geração de auto-anticorpos. Acredita-se que defeitos na regulação do processo de apoptose contribuem para a não eliminação de células autorreativas bem como para a persistência de autoantígenos no organismo (NAGATA; TANAKA, 2017). A hiperplasia sinovial e a infiltração de células do sistema imune na cavidade articular são características marcantes da AR. A formação de um tecido invasivo, conhecido como *pannus*, promove diversas alterações nas articulações sinoviais - como proliferação celular (especialmente de fibroblastos sinoviais) e angiogênese - as quais assemelham-se às mudanças observadas no processo de transformação maligna de células. Acredita-se que o desbalanço entre a proliferação celular e os eventos de apoptose assumem papel central na indução desse processo hiperplásico, além de contribuir para a manutenção do processo inflamatório (POPE, 2002). A desregulação entre esses eventos inclui um conjunto de células e moléculas dentre as quais pode-se destacar: a participação de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-15 na proteção contra os eventos de apoptose induzida por Fas em células sinoviais; a produção de inibidores de apoptose como c-FLIP por macrófagos e fibroblastos sinoviais; a presença de óxido nítrico no líquido sinovial que é capaz de inibir a ação de caspase-3; presença de metaloproteinases no líquido sinovial que participam da produção de FasL solúvel (sFasL); e o acúmulo das formas solúveis de Fas (sFas) e sFasL na articulação sinovial que bloqueiam a interação com as respectivas proteínas de membrana, inibindo a sinalização para apoptose (AUDO et al., 2014; LE GALLO et al., 2017; PENG, 2006; SAHIN et al., 2007).

A patogênese da AR ainda inclui o influxo de células do sistema imune como macrófagos, células dendríticas, NK, linfócitos T e B na articulação sinovial, células estas que também estão susceptíveis à regulação mediada pelos eventos descritos acima. A desregulação do processo de apoptose nessas células também contribui para sua permanência no ambiente articular e perpetuação dos processos inflamatórios. Macrófagos sinoviais presentes em pacientes com AR expressam Fas e FasL indicando uma susceptibilidade dessas células ao processo de apoptose. Fas ainda é expresso por

outros subtipos celulares presentes na articulação como fibroblastos e linfócitos. Apesar de expressarem moléculas capazes de induzir a morte celular, estudos *in vivo* descrevem baixas taxas de apoptose nessas células. Estudos demonstram que essas mesmas células expressam c-FLIP, molécula atuante na inibição da via extrínseca de apoptose. A ação de c-FLIP também parece atuar no bloqueio do processo de apoptose em fibroblastos sinoviais, enquanto que a ativação da via PI3K/Akt1 estimula a proliferação dessas células. Ainda, a expressão de c-FLIP nessas células parece ser induzida pela ação de TNF- $\alpha$  (GAO et al., 2016; LIU; POPE, 2003; POPE, 2002).

O acúmulo de linfócitos T e B na articulação sinovial também é parte importante do processo de patogênese da AR. Um estudo realizado por Aldahlawi et al., (2015) demonstrou o acúmulo de células CCR7+ CD95+ CD4+ em pacientes com AR e doença ativa, inferindo que CCR7 e CD95/Fas estão relacionados com a progressão da doença e possivelmente com o processo inflamatório *per se*. Contudo, apesar de células T isoladas da articulação de pacientes com AR serem passíveis de morte celular devido a presença de Fas, a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-xL as tornam mais resistentes a esse processo (RAZA et al., 2006; SALMON et al., 1997).

Com relação às células NK, observa-se que os diferentes subgrupos celulares apresentam diferenças na susceptibilidade à apoptose *in vitro*. Quando estimuladas por IL-2, células CD56<sup>dim</sup> apresentam maiores taxas de apoptose em comparação a células CD56<sup>bright</sup> (AGGARWAL; SHARMA; BHATNAGAR, 2014; CHALAN et al., 2016). Esse fato pode estar relacionado a expressão de moléculas CD94/NKG2 na superfície de células NK CD56<sup>bright</sup>, uma vez que menores taxas de apoptose foram observadas em células T-CD8+ e NK de camundongos infectados com *Lysteria monocytogenes* que expressavam CD94/NKG2 (GUNTURI; BERG; FORMAN, 2003a). De forma oposta, outros estudos já descreveram o aumento de apoptose em células NK que expressavam CD94 e uma ausência de efeito da presença de CD94/NKG2A sobre o acúmulo de células T-CD8+ e NK na infecção por citomegalovírus (CAVANAUGH; RAULET; CAMPBELL, 2007; IDA et al., 1997). Os resultados obtidos por Gunturi et al., (2003) poderiam explicar, pelo menos em parte, a diminuição do número de células NK periféricas e o prejuízo de sua atividade citotóxica, além do acúmulo de células NK, particularmente CD56<sup>bright</sup>, no líquido sinovial de pacientes com AR.

Dentre todos os fatores envolvidos no processo de apoptose, estudos destacam a participação das moléculas Fas/FasL na patogênese das doenças autoimunes (NAGATA;



TANAKA, 2017). Devido a sua importância esse sistema será detalhado separadamente, assim como Bcl-2 e p53, que também representam tópicos de interesse do presente trabalho.

## **O sistema FAS/FASL**

A proteína Fas, também conhecida como CD95 é um importante receptor transmembrana tipo I pertencente à família TNF. Esse receptor é composto por um domínio extracelular amino-terminal rico em cisteína que contribui para a especificidade de ligação à CD95L (FasL) e um domínio de morte na porção citoplasmática que regula a ativação da via extrínseca de apoptose (LE GALLO et al., 2017). A molécula de FasL é uma proteína de membrana homotrimérica, ligante de Fas, composta por um domínio transmembrana, um domínio intracelular rico em prolina e um domínio extracelular. (NAGATA; TANAKA, 2017; YAMADA et al., 2017)

Na AR, além dos receptores Fas e FasL de membrana, destaca-se a participação de suas isoformas solúveis. A molécula de sFasL é originada a partir da clivagem de FasL por metaloproteinases, enquanto que sFas é formada a partir de *splicing* alternativo do mesmo gene *FAS* (HONG et al., 2015). A ativação da via de apoptose mediante interação de Fas/FasL requer a oligomerização do receptor Fas para ativação de DISC, no entanto, apesar das duas formas de FasL - ligada à membrana e forma solúvel - serem potencialmente capazes de interagir com Fas de membrana, sFasL não permite a formação de oligômeros com Fas e, por conseguinte, não ativa o sinal de apoptose (CALMON-HAMATY et al., 2015; PENG, 2006; YAMADA et al., 2017). Por sua vez, a forma solúvel de Fas se liga à FasL de membrana bloqueando a sua interação com o receptor Fas de membrana (HONG et al., 2015). Ainda, infere-se que a presença de Fas atua na proliferação de fibroblastos sinoviais e indução de inflamação através da via de sinalização PI3K/Akt (LI et al., 2014).

Considerando que diferentes estudos apontam para um papel das proteínas de Fas/FasL na patogênese da AR e demais doenças autoimunes, sugere-se que variações nos genes responsáveis pela produção de tais moléculas podem conferir diferente susceptibilidade ao desenvolvimento da doença bem como modular sua progressão. O gene *FAS* está localizado no cromossomo 10q23, e é composto por nove éxons e oito íntrons. Neste gene, dois polimorfismos são amplamente estudados no contexto nas

doenças autoimunes: -670 A>G rs1800682 e -1377 G>A rs2234767, ambos localizados na região promotora. A presença dessas variantes modula a ligação dos fatores de transcrição Sp1 (do inglês, *stimulatory protein 1*) e STAT1 (do inglês, *signal transducer and activator of transcription 1*) à região alterando, conseqüentemente, a expressão gênica de *FAS* (HUANG; MORRIS; MANOLIOS, 1997).

O gene *FASL* está localizado no cromossomo 1q23 e consiste de quatro éxons que codificam 281 aminoácidos. De forma semelhante à *FAS*, dois polimorfismos destacam-se na literatura: -844 C>T rs763110 e INV2nt\_124A>G, rs5030772. O primeiro está na região promotora do gene e apresenta-se como um potencial sítio de ligação para o fator de transcrição *CAAT/enhancer-binding protein*, enquanto que o segundo está localizado no íntron 2 sendo um potencial alvo de *splicing* alternativo (WU et al., 2017).

A investigação quanto ao papel de polimorfismos em *FAS* com a susceptibilidade à AR apresenta resultados discordantes. Enquanto um estudo demonstrou associação do genótipo GG -1377 G>A com início precoce de AR, outro trabalho relacionou a presença do alelo A da mesma variante ao risco de desenvolvimento de AR (HUANG et al., 1999; ZHU et al., 2016). De forma semelhante, a presença do alelo A do polimorfismo -1377 G>A foi associada ao desenvolvimento de LES (LEE et al., 2012a; LEE; BAE; SONG, 2015). Para o polimorfismo -670 A>G a presença do alelo G foi associada à susceptibilidade a LES e outras doenças autoimunes (BOLLAIN-Y-GOYTIA et al., 2014; LEE et al., 2012a). Diferentemente desses resultados, uma série de estudos disponíveis na literatura não evidenciam associação entre esses polimorfismos e o desenvolvimento de AR (KOBAK; BERDELI, 2012; MOHAMMADZADEH et al., 2012; YILDIR; SEZGIN; ERDAL, 2013).

Com relação aos polimorfismos em *FASL*, a presença do alelo T e dos genótipos CT e TT do polimorfismo -844 C>T foi associada a um maior risco para o desenvolvimento de AR (YILDIR; SEZGIN; ERDAL, 2013), enquanto que em LES, a presença do alelo C foi associada a susceptibilidade à doença (MOUDI et al., 2013). Outros estudos não demonstraram influência de variantes em *FASL* no desenvolvimento de AR (KOBAK; BERDELI, 2012; MOHAMMADZADEH et al., 2012; ZHU et al., 2016).

Alguns estudos demonstram ainda que essas variantes em *FAS* e *FASL* podem modular os níveis de sFas e sFasL, apesar de não existir um consenso na literatura sobre tal relação. Um aumento nos níveis de sFas foi observado em pacientes com LES

portadores dos genótipos GG e AG do polimorfismo -670 G>A comparado a portadores do genótipo AA (BOLLAIN-Y-GOYTIA et al., 2014). Em pacientes com síndrome de Sjögren primária, maiores níveis de sFas foram associados ao genótipo AA em comparação ao genótipo GG (TREVINO-TALAVERA et al., 2014). Com relação a *FASL*, a presença do alelo C do polimorfismo -844 C>T foi associada a maior expressão do FasL de membrana e maiores níveis de sFasL quando comparado com o genótipo TT (WU et al., 2017; ZHANG et al., 2006).

## **A família BCL-2**

O controle e regulação dos eventos de apoptose mediados pela mitocôndria são promovidos por membros da família Bcl-2 (do inglês, *B cell lymphoma 2 family*). Vinte e cinco genes compõem a família de Bcl-2, os quais dão origem a proteínas pró-apoptóticas como Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik e Blk; e anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG. As moléculas pró-apoptóticas Bax e Bak podem induzir diretamente o processo de apoptose formando oligômeros na membrana mitocondrial à medida que recebem o sinal de morte celular, levando a desestabilização dessa membrana pela formação de um canal permeável e liberação de citocromo c, recrutamento de Apaf-1 e ativação de caspases. As demais proteínas pró-apoptóticas atuam estimulando a oligomerização de Bak ou Bax ou inibindo a ação de proteínas anti-apoptóticas (ELMORE, 2007; FESIK, 2005; IGNEY; KRAMMER, 2002).

A proteína anti-apoptótica Bcl-2 é normalmente expressa em células B e T. Na AR, acredita-se que as baixas taxas de apoptose associadas a linfócitos T são devidas à expressão elevada de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-2 nessas células (FIRESTEIN; YEO; ZVAIFLER, 1995; VAN DER GEEST et al., 2014). Em fibroblastos sinoviais de pacientes com AR observa-se um aumento da expressão mRNA de Bcl-2 e menores níveis de mRNA de Bax quando comparado a pacientes com osteoartrite (LEE et al., 2013). Em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com AR também observa-se menor expressão de Bax e elevada expressão de Bcl-2 (SZODORAY et al., 2003).

Variações no gene *BCL-2*, podem alterar sua função e/ou expressão e consequentemente provocar um desequilíbrio nos mecanismos reguladores de apoptose. Este gene está localizado no cromossomo 18q21.3 e consiste de 3 éxons e 2 promotores

(NÜCKEL et al., 2007; TSUJIMOTO et al., 1985). O alelo Thr do polimorfismo rs1800477 (G127A, Ala43Thr), no éxon 2 do gene, foi associado a um efeito protetor no desenvolvimento de doenças autoimunes (incluindo RA, LES e Síndrome de Sjögren) em uma população japonesa (KOMAKI et al., 1998). Para o polimorfismo da região promotora (rs2279115 -938 C>A), 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 e linfoma não-hodgkin (NÜCKEL et al., 2007; WANG et al., 2014). No contexto da AR, dois polimorfismos já foram estudados: rs12454712 T>C e rs17757541 C>G. A presença do genótipo heterozigoto de rs17757541 foi associada com o desenvolvimento de AR quando o genótipo CC foi utilizado como referência. Quando agrupados os genótipos CG e GG, manteve-se o mesmo efeito. Por fim, o polimorfismo rs12454712 T>C não demonstrou influência na susceptibilidade à AR (ZHU et al., 2016).

## **A proteína p53**

Descoberta em 1979, a proteína p53 está envolvida em vários processos celulares incluindo proliferação, senescência, diferenciação, apoptose, reparo de DNA, metabolismo, angiogênese e autofagia. Destaca-se também o papel dessa molécula como fator de transcrição de diversos genes (SABAPATHY; LANE, 2018; ZILFOU; LOWE, 2009). Sua função mais notória está relacionada à capacidade de supressão tumoral, pois atua na prevenção da proliferação de células que apresentam material genético alterado (BROWN; ATTARDI, 2005). A inativação de p53 em modelos tumorais *in vitro* diminui a ocorrência dos eventos de apoptose e propicia a expansão do tumor. Acredita-se que aproximadamente 50% dos tumores de diferentes tipos apresentam mutações em *TP53* (SABAPATHY; LANE, 2018; ZILFOU; LOWE, 2009). Adicionalmente, 80% das mutações de *TP53* encontradas em tumores localizam-se na região de domínio de ligação ao DNA, indicando que a atividade de p53 como fator de transcrição é crucial para o processo de supressão tumoral (BIEGING; MELLO; ATTARDI, 2014; ZILFOU; LOWE, 2009).

A participação de p53 nos processos de apoptose pode ocorrer a partir de diferentes vias. Sua atuação como fator de transcrição pode induzir a expressão de genes pró-apoptóticos, como *BAX* e *FAS*, ou reprimir genes anti-apoptóticos, como *BCL-2*.

Adicionalmente, a interação de p53 com outros membros da família Bcl-2, como NOXA e PUMA, influencia especialmente a ativação da cascata intrínseca de apoptose (ASHKENAZI, 2008; VOUSDEN; LANE, 2007). Por outro lado, p53 pode ativar de maneira independente a via intrínseca de apoptose alterando diretamente o potencial de membrana mitocondrial (MARCHENKO; ZAIKA; MOLL, 2000).

Na AR, a elevada taxa de remodelamento tecidual e a formação de um tecido hiperplásico justifica a investigação do papel de p53 na patogênese da doença (POPE, 2002). Em tecido sinovial, análises histoquímicas e de *Western-blot*, demonstraram maior expressão de p53 em pacientes com AR quando comparados a tecidos sinoviais provenientes de pacientes com osteoartrite ou tecidos não-inflamatórios (FIRESTEIN et al., 1996). Em outro estudo, também foi observado maior expressão de p53 em pacientes com AR quando comparados a pacientes com osteoartrite e pós-trauma articular. Nesses indivíduos, a maioria das células positivas para a expressão de p53 em tecido sinovial eram fibroblastos e 80% dessas células encontravam-se sob processo de apoptose (CHOU; YANG; LEE, 2001). Por outro lado, alguns estudos demonstram a presença de mutações somáticas em *TP53* de células sinoviais de indivíduos com AR. Essas mutações poderiam suprimir as funções da proteína p53 nativa e inibir o processo de apoptose nessas células (FIRESTEIN et al., 1997; YAMANISHI et al., 2002).

Considerando todos esses resultados, especula-se que p53 esteja envolvida na susceptibilidade a AR, pois além desta molécula atuar como fator de regulação da transcrição de genes pró e anti-apoptóticos como *BAX*, *FAS* e *BCL-2*, a presença de mutações em *TP53* em células sinoviais prejudica sua atuação na indução da apoptose, contribuindo para a proliferação de células e inflamação tecidual (MÜLLER-LADNER; NISHIOKA, 2000; ZHANG et al., 2016).

O gene *TP53* foi mapeado no cromossomo 17 (17p13.1) (McBride et al., 1986). Dentre as variações genéticas encontradas em *TP53*, o polimorfismo Pro72Arg é o mais estudado. Esse polimorfismo resulta de uma mudança de uma única base C>G na sequência nucleotídica que acarreta a substituição do aminoácido prolina pelo aminoácido arginina no códon 72. Este códon encontra-se dentro de um motivo rico em prolina, o qual está diretamente relacionado à capacidade de ligação de p53 à mitocôndria e, portanto, a seu potencial na indução de apoptose (MATLASHEWSKI et al., 1987). Estudos *in vitro* demonstram que o alelo arginina apresenta maior potencial na indução de apoptose quando comparado ao alelo prolina (DUMONT et al., 2003). Os estudos que

investigaram o papel dessa variante em AR, apesar de escassos, não apontam para uma influência desse polimorfismo na susceptibilidade à doença em diferentes populações (ASSMANN et al., 2009; LEE et al., 2001, 2012b; MACCHIONI et al., 2007; MOODLEY; MODY; CHUTURGOON, 2010).

**CAPÍTULO 2**  
**JUSTIFICATIVA**

## CAPÍTULO 2: JUSTIFICATIVA

A AR é uma patologia de caráter autoimune e sistêmico altamente debilitante. Seu mecanismo etiológico ainda não está completamente esclarecido, porém acredita-se que tanto fatores genéticos quanto ambientais influenciam no desenvolvimento da doença. A inflamação crônica e progressiva presente nas articulações sinoviais é uma das principais características da AR, juntamente com o desenvolvimento de um processo hiperplásico que resulta na formação de um tecido invasor conhecido como *pannus*, o qual penetra na cavidade articular, invadindo a cartilagem e o tecido ósseo. Neste contexto, diversos mecanismos parecem estar envolvidos na indução e persistência do processo inflamatório.

Uma das hipóteses descritas na literatura refere-se a uma desregulação do processo de apoptose, a qual ocasiona o acúmulo de células em tecidos sinoviais bem como a proliferação de células que contribuem para exacerbação do processo inflamatório. A apoptose é um evento celular regulado por uma intrincada rede de moléculas (como Fas/FasL, moléculas da família Bcl-2, p53 e caspases), sendo um processo importante na manutenção da homeostase do organismo com a eliminação de células auto reativas.

Acredita-se que uma perturbação dos eventos de apoptose também ocorra em células do sistema imune que infiltram a articulação como linfócitos T-CD4+, T-CD8+ e *Natural Killer*, uma vez que o acúmulo dessas células já foi descrito em líquido sinovial de pacientes com AR. As células NK apresentam um perfil diferenciado no líquido sinovial de pacientes com AR quando comparado com sangue periférico destes mesmos pacientes. Adicionalmente, no líquido sinovial, estas células podem exercer um importante papel imunomodulatório através da liberação de citocinas, papel este que está relacionado à expressão de receptores NKG2 na superfície celular. Ainda, a expressão de NKG2 pelas células NK parece estar associada a menores taxas de apoptose nessas células, o que contribuiria para a permanência dessas células na articulação e perpetuação do processo inflamatório.

O presente trabalho apresenta três abordagens distintas: a primeira está relacionada ao estudo da contribuição das variantes em genes NKG2 na susceptibilidade e gravidade da AR devido à importância desses receptores na indução e manutenção da inflamação na articulação sinovial de pacientes com AR. A segunda abordagem visa a investigação do papel de polimorfismos nos genes das vias intrínsecas e extrínsecas de



apoptose no desenvolvimento da AR bem como na severidade da doença. A terceira abordagem refere-se à investigação dos níveis de fatores solúveis Fas, FasL e citocinas em diferentes grupos de pacientes. A apoptose é um tema que se destaca no contexto da AR, uma vez que trata de um dos principais processos relacionados às alterações descritas nas articulações sinoviais dos pacientes com AR bem como à perda do equilíbrio na eliminação de células autorreativas. Cabe salientar que o presente trabalho utiliza diferentes abordagens metodológicas para atingir os objetivos propostos e que os resultados obtidos contribuirão para o entendimento das bases genéticas e moleculares envolvidas na patogênese da AR. Por fim, ressalta-se o ineditismo da investigação desses fatores, especialmente os genéticos, na população brasileira no contexto da AR.

## **CAPÍTULO 3**

### **OBJETIVOS**

## CAPÍTULO 3: OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Identificar o papel dos receptores de células *Natural Killer* e das proteínas de apoptose na patogênese da Artrite Reumatoide.

### Objetivos específicos

- Avaliar quatro variantes polimórficas em genes *NKG2* em indivíduos com AR e em indivíduos controle, descrevendo as frequências alélicas, genótípicas e haplotípicas. As variantes a serem avaliadas são: c. 338-90G>A em *NKG2A*, deleção de *NKG2C*, Ala72Thr; c.214 G>A e c.\*348C>G de *NKG2D*.
- Avaliar em indivíduos com AR e em indivíduos controle seis variantes polimórficas em genes que codificam proteínas envolvidas no processo de apoptose, comparando as frequências alélicas, genótípicas e haplotípicas entre os grupos. Dentre os polimorfismos descritos para os genes de interesse foram incluídos -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 Pro72Arg (G12139C) do gene *TP53*.
- Comparar os níveis de Fas e FasL solúveis em plasma e líquido sinovial de indivíduos com AR, osteoartrite e trauma de joelho e correlacionar esses níveis com a atividade da doença em pacientes com AR.
- Avaliar o padrão qualitativo e quantitativo (perfil) de citocinas (Th1, Th2 e Th17) em plasma e líquido sinovial de indivíduos com AR, osteoartrite e trauma de joelho.

## **CAPÍTULO 4**

**Artigo original** “*NKG2 in Rheumatoid Arthritis: the influence of NKG2 polymorphisms on disease susceptibility in a Brazilian population and a comprehensive review*”

Artigo em preparação para submissão ao periódico *International Journal of Immunogenetics*.

## CAPÍTULO 4: ARTIGO ORIGINAL 1

### **NKG2 in Rheumatoid Arthritis: the influence of NKG2 polymorphisms on disease susceptibility in a Brazilian population and a comprehensive review.**

Maria Cristina Cotta Matte<sup>a</sup>, Brenda Beltrame<sup>a</sup>, Claiton Viegas Brenol<sup>b</sup>, Ricardo Machado Xavier<sup>b</sup>, José Artur Bogo Chies<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

#### **Corresponding author**

José Artur Bogo Chies

*Permanent Address*

Department of Genetics

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves, 9500

Caixa Postal 15053

91501-970 Porto Alegre, RS

Brazil

Email address: jabchies@terra.com.br

**Key words:** Rheumatoid arthritis, NKG2, polymorphisms.

## Summary

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disorder associated to an excessive activation of innate and adaptive immune responses. The pathogenesis of RA encompasses synovial lining hyperplasia and immune system cellular influx to the joints and is characterized by a chronic inflammatory condition. The NKG2 family consists of five molecules – NKG2A/B, C, D, E/H, F - that could be divided in activating and inhibitor surface receptors. The balance between the signals delivered by these molecules coordinates the activation of Natural Killer (NK), CD4+ T, and CD8+ T cells, contributing therefore to the immune system regulation and to the inflammatory process observed in RA. The present study investigated the influence of *NKG2* polymorphisms in RA susceptibility and disease severity. In this case-control study, 376 RA Caucasian patients and 322 Caucasian healthy subjects from the south of Brazil were genotyped for *NK2GA* (rs2734440), *NKG2D* (rs2255336 and rs1049174) and *NKG2C* polymorphisms. Genotyping was performed by either Real-time TaqMan™ PCR or conventional PCR. No association of *NKG2* genetic variants and RA susceptibility or disease severity was observed. Our results corroborate some previous published data. However, considering the limited data available in the literature especially in Caucasian populations, and the existence of controversial findings, we suggest that more studies should be conducted in order to contribute to the knowledge of the role of NKG2 variants on RA pathogenesis.

## Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disorder associated to an excessive activation of innate and adaptive immune responses that result from the interplay between genetic and environmental factors. RA affects 0.5 to 1% of the world population and is three times more prevalent in women as compared to men. In RA, the loss of immune self tolerance culminates in severe joint damage and irreversible destruction of the synovial membrane, cartilage, and bone (Pope, 2002; Firestein and McInees, 2017).

Hallmarks of the disease pathogenesis are synovial membrane hyperplasia and the influx of immune system cell to the joints. Amongst these cells, Natural Killer (NK), CD4<sup>+</sup> T, and CD8<sup>+</sup> T cells stands out in their contribution to the induction of the chronic inflammation seen in RA (McInees and Schett, 2011). The function of these cells is regulated by a balance between activating and inhibitory signals delivered by a wide range of cell surface molecules, including lectin-like receptors such as NKG2. The NKG2 family consists of five molecules – NKG2A/B, C, D, E/H, F – encoded by several genes clustered in a region of 270 kb mapped on chromosome 12. These receptors are mainly expressed by NK cells, although they can also be found on the surface of CD8<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T cells, acting as co-stimulatory molecules. Additionally, they are found covalently dimerized with the CD94 molecule, with the exception of NKG2D, which is expressed as a homodimer (Borrego *et al.*, 2006).

An enhanced NKG2/CD94 expression was observed in CD56<sup>bright</sup> NK cells purified from inflammatory sites. Of note, the major function of this cell subset is related to the production of pro-inflammatory cytokines. NKG2C and NKG2D, when bounded to specific ligands on the target cell surface, trigger NK functions through the transduction of an activating cell signaling. The MHC class Ib HLA-E molecule is recognized by the NKG2C receptor, whereas NKG2D interacts with MIC-A, MIC-B and ULBPs. Conversely, NKG2A negatively regulates cell functions when bounded to the HLA-E molecule (Synder *et al.*, 2004; Borrego *et al.*, 2006).

Several studies point to an important role of NKG2 molecules in the induction and perpetuation of the inflammatory processes observed in RA. The presence of NK CD56<sup>bright</sup> cells in synovial joints contributes to the synovial inflammation through TNF- $\alpha$  and INF- $\gamma$  production as well as through immune signaling mediated by cell-cell contacts (Dalbeth and Callan, 2002; de Matos *et al.*, 2007; van Bijen *et al.*, 2011). Additionally, high levels of IL-15 and TNF- $\alpha$  contribute to the expansion of the NKG2D<sup>+</sup> T cell population in the peripheral blood and in synovial tissues of the RA patient (Groh

*et al.*, 2003). Finally, low apoptotic levels were detected in cells expressing the CD94/NKG2 molecule, which might contribute to the maintenance of the CD8+ T and NK cells repertoires in the RA synovial joints (Gunturi *et al.*, 2003).

NKG2 molecules are much less variable at the genetic level than are the members of the Killer Immunoglobulin-like receptor family (KIR) (Pegram *et al.*, 2011). However, polymorphisms in *NKG2* genes have already been described and were associated to several diseases and/or clinical conditions (Espinoza *et al.*, 2009; Kabalak *et al.*, 2010; Roszak *et al.*, 2012; Taniguchi *et al.*, 2015; Iwasko *et al.*, 2016). The molecular diversity of *NKG2* genes includes the total absence of the *NKG2C* gene, which occurs in high frequencies in different human populations (Hikami *et al.*, 2003). Moreover, single nucleotide polymorphisms within *NKG2* genes might influence receptor expression, and consequently its functions. Understanding the role of these molecules in RA susceptibility and in clinical manifestations of this condition may provide further information about disease pathogenesis, potentially contributing to the development of new therapeutic strategies. Therefore, the aim of this study was to evaluate potential relationships of *NKG2A*, *NKG2C* and *NKG2D* polymorphisms and disease susceptibility and severity in a Brazilian RA cohort.

## **Materials and Methods**

### *Subjects*

The study population consisted of 376 RA Caucasian patients and 322 Caucasian healthy subjects from Porto Alegre, capital of the southernmost state of Brazil. RA patients were recruited at the Division of Rheumatology of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA, Porto Alegre, Brazil), and were diagnosed according to the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria for RA (Aletaha *et al.*, 2010). Patients having any other autoimmune disease were excluded. The control group was composed by healthy blood donor individuals, without a family history of autoimmune diseases, as declared in a standard questionnaire.

Clinical and laboratory data, such as positivity to rheumatoid factor, anti-citrullinated protein antibodies (ACPAs), bone erosions, extra articular manifestations, smoking, abusive alcohol consumption, presence of secondary Sjögren's syndrome, and disease activity score (DAS28) were collected from the patient's medical records. The highest DAS28 index registered in medical charts throughout RA patients clinical follow-



up was used to access disease severity. Data concerning positivity to rheumatoid factor was available for 346 out of the 376 RA patients, although data concerning ACPAs (a nonconventional test in terms of the Brazilian public healthcare system) was available to only 64 patients. All participants of this study signed a written informed consent. The study protocol was approved by the Medical Ethics Committee of the HCPA (CAAE 52996015.6.0000.5327).

#### *DNA Extraction and Genotyping*

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples through a salting-out technique, as described by Lahiri and Nurnberger (1991). Genotyping of *NKG2A* rs2734440 (c.338-90 A>G; intron 4), *NKG2D* rs2255336 (Ala72Thr; c.214 G>A; exon 6) and rs1049174 (c.\*348C>G; 3' UTR) polymorphisms were performed by Real-time TaqMan™ PCR on an Applied Biosystems StepOne PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's standard protocols.

The *NKG2C* gene variant was analyzed by conventional polymerase chain reaction (PCR) in which two pairs of primers were designed. Specific primers annealing to gene-flanking regions create a 411bp DNA fragment in the absence of the *NKG2C* gene. The second pair of primers amplifies a 201bp fragment in an internal gene region (Moraru *et al.*, 2012). Amplified fragments were visualized in a 2% agarose gel with ethidium bromide, under ultraviolet light. In order to avoid genotyping errors, genotyping was repeated in 10% of the samples.

#### *Statistical Analysis*

The genotype and allele frequencies were determined by direct counting. Allelic and genotypic frequencies were compared between patients and controls using the Chi-square test ( $\chi^2$ ) and Yates's correction when appropriated. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI) were calculated to assess the relative risk conferred by a specific allele or genotype in RA susceptibility or disease severity. Comparisons between the polymorphisms and continuous variables were performed using ANOVA. The significance level was set at  $\alpha=0.05$  (two tailed). All statistical analyses were performed with SPSS 18.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Haplotype and linkage disequilibrium (LD) analyses between the three polymorphisms were performed using Haploview version 4.2 (Barrett *et al.*, 2005).

## Results

### *Clinical and demographic features*

Clinical and demographic features of the 376 RA patients and 322 healthy individuals are shown in Table 1. An increased proportion of females was observed in the RA group (81.6%) compared to the control group (46.3%) ( $p < 0.01$ ). In addition, the mean age at diagnosis for RA patients ( $46.3 \pm 13.8$ ) was higher compared to the control group mean age ( $41.9 \pm 9.4$ ) ( $p < 0.001$ ). Within the RA group, 86.7% of the patients had positive RF. Secondary Sjögren's syndrome was observed in 5.11% of the patients. Extra articular manifestations were reported in 31.2% of the individuals, being rheumatoid nodules the most frequent manifestation observed (24%), followed by episcleritis and vasculitis. The presence of extra articular manifestations was significantly associated to RF positivity ( $\chi^2$  with Yates's correction  $p = 0.018$ ). Disease activity score (DAS28) mean was 4.83 ( $\pm 1.72$ ). Similar values of DAS28 were observed between RF seropositive and seronegative RA patients ( $5.53 \pm 1.48$  vs  $5.34 \pm 1.15$ ).

### *Association between the NKG2 polymorphisms and RA susceptibility*

The genotypic distributions for *NKG2D* rs1049174C>G, rs2255336C>T, *NKG2A* rs2734440G>A, and *NKG2C* were in Hardy-Weinberg equilibrium for both RA patients and controls. The genotypic and allelic frequencies did not differ between patients and controls for any of the studied polymorphisms (Table 2) even when different genetic models were explored (dominant, recessive, and additive models). An additional regression model including sex and age was also tested and similar results were obtained (data not shown).

### *Association between the NKG2 polymorphisms, disease phenotypes, and clinical manifestations*

In order to unveil the potential impact of *NKG2* polymorphisms on RA phenotypes and severity we investigated genotypes and alleles association with the presence of extra articular manifestations, secondary Sjögren's syndrome, DAS28 score and remission status (considered as at least one measure of DAS28  $< 2.6$ ). No association between the *NKG2A*, *NKG2D* and *NKG2C* polymorphisms and RA clinical manifestations and severity was observed (Table 3). Again, no differences were observed when the RA patients were classified according to RF positivity (data not shown).

### *Linkage disequilibrium amongst NKG2 polymorphisms*

Linkage disequilibrium analysis was performed for *NKG2D* and *NKG2A* polymorphisms. The  $D'$  and  $r^2$  analyses showed a strong linkage disequilibrium amongst the polymorphisms, with  $D'$  values  $>0.9$ . The *CCA* haplotype (*NKG2D* rs1049174, *NKG2D* rs2255336, and *NKG2A* rs2734440, respectively) was the most frequent among both patients (64.9%) and controls (62.2%) ( $p=0.329$ ). Three other haplotypes were identified (*GTG*, *GCG*, and *CCG*), although similar frequencies for such haplotypes were also observed between the studied groups.

### **Discussion**

Natural killer cell activation signaling results from complex interactions of several activating and inhibitor surface receptors and their respective ligands. NKG2 is a family of molecules included amongst these receptors and exerts an important role in the regulation of NK cells functions. Additionally, it was suggested that these receptors can act as co-stimulatory molecules in T lymphocytes (Borrego *et al.*, 2006; Synder *et al.*, 2004). Considering the involvement of NKG2 molecules in self-tolerance maintenance and in the modulation of immune responses, it was hypothesized that genetic variants in *NKG2* might influence the pathogenesis of autoimmune diseases such as RA. However, evidences for such a behavior are limited so far. Thus, the present study investigated the potential relationship among *NKG2A* (rs2734440), *NKG2D* (rs1049174 and rs2255336) variants, and *NKG2C* deletion and RA susceptibility, and disease severity in a Caucasian population from the south of Brazil. Moreover, we provide a comprehensive review of the major literature findings considering *NKG2* polymorphisms influence within different immune contexts.

In the present study, no association between genotypic or allelic frequencies of *NKG2A* (rs2734440), *NKG2D* (rs1049174 and rs2255336) and *NKG2C* polymorphisms and RA susceptibility was observed, even when distinct genetic models were tested. Conflicting results have been described for *NKG2A* variants. While some studies pointed to a lack of association to disease susceptibility (Iwasko *et al.*, 2016; Hikami *et al.*, 2003; Mariaselvam *et al.*, 2016), one study conducted with Korean RA patients observed a protective effect of the *NKG2A* rs2734440 AA genotype on disease susceptibility (Park *et al.*, 2008). In a study approaching Behcet's disease (BD), a significant lower frequency

of *NKG2A* rs2734440 G allele and of the c.-4258\*C allele were observed in BD patients compared to healthy controls (Seo et al., 2007).

Considering *NKG2D* polymorphisms, a higher risk for RA susceptibility was associated to the rs2255336 AA genotype (Thr/Thr). The risk increased 12-fold in the combined presence of Thr/Thr and *NKG2C* Ser/Ser (Ser102Phe; c305C>T) genotypes (Park et al., 2008). In systemic lupus erithematosus (SLE), the same rs2255336 Thr allele presented an opposite effect to disease susceptibility in a Polish cohort and in a German population (Kabalak et al., 2010; Piotrowski et al., 2012). This difference can be attributed to specific features of each disease. The inflammatory condition observed in RA seems to be related to the presence of the activating receptors *NKG2C* and *NKG2D* in synovial joints, which stimulate the release of pro-inflammatory cytokines by NK cells (Groh et al., 2003; de Matos et al., 2007). In SLE, in contrast, the presence of *NKG2D* in CD4+ cells seems to exert regulatory activity, once the presence of *NKG2D*+ T cells was inversely correlated to juvenile SLE onset (Dai et al., 2009).

In our study, no influence of *NKG2* polymorphisms in the disease severity, remission status and clinical manifestations was detected. In contrast to our data, in addition to the influence on disease susceptibility, *NKG2D* polymorphisms were already associated with RA severity (Mariaselvam et al., 2016), while *NKG2A* variants have been associated to differences in anti-TNF treatment response (Iwasko et al., 2016).

Several studies reported strong linkage disequilibrium among eight *NKG2D*-*NKG2A* variants, which originates two haplotypes alleles associated to high and low natural cytotoxic activity levels of NK cells (Mariaselvam et al., 2016; Hayashi et al., 2006). In the present study, a strong linkage disequilibrium among *NKG2D*-*NKG2A* variants was also observed. The most frequent haplotype observed was CCA (rs1049174, rs2255336, and rs2734440 respectively), albeit haplotype frequencies did not differ between RA patients and controls. More recently, since *NKG2D* rs1049174 demonstrated the closest association with *NKG2D* expression in NK and CD8+ T cells, this variant was suggested to be used as a tagSNP (Imai et al., 2012; Espinoza et al., 2016).

A potential role of the *NKG2C* deletion on RA development was also recently approached. In our study, the *NKG2C* del allele frequencies were 0.17 and 0.16 respectively for RA patients and controls. These frequencies were quite similar to those observed in other human populations (Thomas et al., 2012; Noyola et al., 2012; Vilchez et al., 2013), excepted for the Mexican mestizo (0.103) and Gambian (0.293) populations

(Rangel-Ramírez *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2016). We observed a higher frequency of the *NKG2C* del/del genotype in RA patients compared to control group (4.5% versus 2.8%) although this difference did not reach statistical significance. Our results corroborate previous data concerning the influence of *NKG2C* deletion in RA and SLE susceptibility (Miyashita *et al.*, 2004) however the same is not true considering other autoimmune diseases. For example, in psoriasis the presence of *NKG2C* deletion alone or combined with *HLA-E\*01:01* allele (*NKG2C* ligand) was described as a risk factor to disease development (Zeng *et al.*, 2013). Importantly, it has been shown that *NKG2C* copy number variation is associated with the amount of receptor expression on the cell surface (Noyola *et al.*, 2012; Rangel-Ramírez *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2016). However, the maintenance of the deleted allele at high frequencies in different populations suggests that the presence of this receptor is not essential for survival and its absence may be compensated by the expression of other NK receptors (Miyashita *et al.*, 2004; Gonçalves *et al.*, 2016).

It is important to highlight that our study evaluated 376 RA individuals and 322 healthy controls, being one of the most important sample analyzed so far in the context of *NKG2* polymorphisms and autoimmunity. In the literature, only five studies addressed the influence of *NKG2* in RA, most of them approaching Asian populations (Hikami *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2008, Miyashita *et al.*, 2004; Mariaselvam *et al.*, 2016). Therefore, the differences observed between our results and these previous data might be due to the genetic background of the studied populations. In the present study, only Caucasian individuals (classified by self-identification) were included, however, it is noteworthy that the Brazilian population has a high level of miscegenation. Additionally, some of the genetic variants previously associated to RA susceptibility in the literature were not investigated in the present study.

Published data considering the potential role of *NKG2* genes variants and its influence on diseases susceptibility and pathogenesis is scarce. In order to contribute to a better comprehension of this field, a literature search was conducted, and thirty-two articles including *NKG2* polymorphisms were selected and summarized in Table 4. Considering viral infections, *NKG2D* polymorphisms – respectively the rs2617160 TT genotype and rs2233556 A allele - were associated to Hepatitis B virus susceptibility and to specific symptoms in human cytomegalovirus infection (Ma *et al.*, 2010; Taniguchi *et al.*, 2015). In chronic Hepatitis C virus infection, the *NKG2D* rs1049174 GG genotype

was associated to a better response to interferon therapy, indicating a potential role of this variant as a marker to sustained virologic response (Asadi-Saghandi *et al.*, 2016). Considering *NKG2C*, the impact of the gene deletion seems to be more pronounced in the infection course rather than in the context of virus susceptibility. The presence of the gene was associated to protection against HIV-1 infection, once a higher proportion of carriers of this variant was found in the long term non-progressor group (LTNP) and also in infected patients with viral load <30,000 copies/mL (Thomas *et al.*, 2012). In HCMV infection, anti-HCMV antibody titers were significantly higher in *NKG2C* deletion homozygous individuals than in *NKG2C* +/+ children, suggesting that a low ability to control of HCMV infections in *NKG2C* del/del carriers may lead to more frequent reactivation and boosting of antibody responses (Goodier *et al.*, 2014). In other viral infections evaluated, such as HSV-1, respiratory virus, HPV and HTLV-1, neither the susceptibility nor the clinical outcomes were influenced by *NKG2C* or *NKG2D* polymorphisms (Talledo *et al.*, 2012; Moraru *et al.*, 2012b; Vilchez *et al.*, 2013; Rangel-Ramírez *et al.*, 2013).

In scenarios of tumor development, the most significant finding was the association of the *NKG2D-NKG2A* HKN1/HKN1 genotype (previously associated to high NK cytotoxic activity) with a reduced risk of cancer in comparison to the LNK1/LNK1 genotype (associated to low NK cytotoxic activity) (Hayashi *et al.*, 2006). A protective effect of the HKN1 haplotype was also observed against aerodigestive tract cancer development (Furue *et al.*, 2008), but no effect of this variant was described concerning HPV-related cancer risk (Vilchez *et al.*, 2013). Other independent associations of *NKG2D* polymorphisms were also described for cholangiocarcinoma and cervical cancer (Melum *et al.*, 2008; Roszak *et al.*, 2012), while no association was evidenced for colon rectal cancer (Melum *et al.*, 2008b). Only one study investigated the relationship between *NKG2C* copy number variation and cancer, although no significant influence was observed (Li *et al.*, 2015).

Due to the importance of the NKG2 family in the regulation of NK cell activity and in the activation of the immune system, polymorphisms in *NKG2* genes were also evaluated in other important conditions involving immune tolerance, such as recurrent miscarriage and in the context of transplantation. In both situations, significant associations were described, especially related to *NKG2D* variants (Espinoza *et al.*, 2009;

Hizem *et al.*, 2014), however, the paucity of studies considering this issue jeopardize conclusions about the actual role of NKG2 variants within these conditions.

In conclusion, the present study investigated the influence of *NKG2A*, *NKG2D* and *NKG2C* polymorphisms in RA susceptibility and disease severity in a Brazilian population. No association of *NKG2* genetic variants and RA was observed, corroborating some of the previous findings from the literature. Differences in the genetic/ethnic background of the studied populations might explain some of the discrepancies found between our results and previous published data. A combined investigation of the *NKG2* genetic variability and expression as well as studies approaching the expression of both *NKG2* and its ligands could bring new insights about the role of these molecules in the RA pathogenesis. In addition, more studies addressing the influence of *NKG2* polymorphisms in other important physiological and pathological conditions, such as viral infections, cancer, pregnancy and transplantation should be conducted in different populations in order to contribute to the knowledge of the role of these genetic variants in the development of distinct immune responses.

### **Funding**

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: this work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### **Contributions**

Study design: MCCM, JABC; Sample selection and recruitment: CVB, RMX; Data collection and Analysis: MCCM, BB and LS; Manuscript preparation: MCCM, JABC.

### **Disclosure Statement**

The authors declare they have no conflict of interest regarding this work.

## References

Aletaha T.D., Neogi AJ, Silman J, Funovits D,T, Felson CO, Bingham NS, Birnbaum GR, Burmester VP, Bykerk MD, Cohen B, Combe KH, Costenbader M, Dougados P, Emery G, Ferraccioli JMW, Hazes K, Hobbs TWJ, Huizinga A, Kavanaugh J, Kay TK, Kvien T, Laing P, Mease HA, Ménard LW, Moreland RL, Naden T, Pincus JS, Smolen E, Stanislawska-Biernat D, Symmons PP, Tak KS Upchurch J, Vencovský F, Wolfe G, Hawker. (2010). Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.*, 62, 2569–2581.

Asadi-Saghandi, A., Shams, A., Eslami, G., Mirghanizadeh, S.A., Eskandari-Nasab, E. (2016). Peginterferon Alfa-2a/Ribavirin treatment efficacy in chronic hepatitis C patients is related to natural killer group 2D gene rs1049174 GC polymorphism. *Virus Disease*, 27(4), 369–374.

Barrett, J.C., Fry, B., Maller, J., Daly, M.J. (2005). Haploview : analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, 21, 263–265.

Borrego, F., Masilamani M., Marusina A.I., Tang, X., Coligan, J.E. (2006). The CD94/NKG2 Family of Receptors - from Molecules and Cells to Clinical Relevance of Rheumatoid Arthritis. *Immunologic Research*. 35, 263-277.

Dai, Z., Turtlem C.J., Booth, G.C., Riddell, S.R., Gooley, T.A., Stevens, A.M., Spies, T., Groh, V. (2009). Normally occurring NKG2D+CD4+ T cells are immunosuppressive and inversely correlated with disease activity in juvenile-onset lupus. *The Journal of Experimental Medicine*, 13, 206(4), 793-805.

Dalbeth, N., Callan, M.F.C. (2002). A Subset of Natural Killer Cells Is Greatly Expanded Within Inflamed Joints. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* 46, 1763-1772.

de Matos, C.T., Berg, L., Michaëlsson, J., Felländer-Tsai, L., Kärre, K., Söderström, K. (2007). Activating and inhibitory receptors on synovial fluid natural killer cells of arthritis patients: role of CD94/NKG2A in control of cytokine secretion. *Immunology*, 122, 291-301.

Espinoza, J.L., Takami, A., Onizuka, M., Sao, H., Akiyama, H., Miyamura, K., Okamoto, S., Inoue, M., Kanda, Y., Ohtake, S., Fukuda, T., Morishima, Y., Koder, Y., Nakao, S., for the Japan Marrow Donor Program (2009). NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. *Haematologica*, 94, 1427-1434.

Espinoza, J.L., Nguyen, V.T., Ichimura, H., Pham, T.T.T., Nguyen, C.H., Pham, T.V., Elbadry, M.L., Yoshioka, K., Tanaka, J., Trung, L.Q., Takami, A., Nakao, S. (2016). A functional polymorphism in the NKG2D gene modulates NK-cell cytotoxicity and is associated with susceptibility to Human Papilloma Virus-related cancers. *Scientific Reports*, 6, 39231

Firestein, G.S., & McInnes, I.B. (2017). Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity* 46, 183-196.



Furue, H., Kumimoto, H., Matsuo, K., Suzuki, T., Hasegawa, Y., Shinoda, M., Sugimura, T., Mitsudo, K., Tohnai, I., Ueda, M., Tajima, K., Ishizaki, K. (2008). Opposite impact of NKG2D genotype by lifestyle exposure to risk of aerodigestive tract cancer among Japanese. *Int. J. Cancer*, 123, 181–186.

Garrido, P., Almeida, J., Romero, J.M., Cantón, J., Sandberg, Y., Bárcena, P., Lima, M., Langerak, A.W., Orfao, A., Ruiz-Cabello, F. (2008). Evaluation of functional single nucleotide polymorphisms of different genes coding for the immunoregulatory molecules in patients with monoclonal large granular lymphocyte lymphocytosis. *Human Immunology*, 69, 101-107.

Goncalves, A., Makalo, P., Joof, H., Burr, S., Ramadhani, A., Massae, P., Malisa, A., Mtuy, T., Derrick, T., Last, A.R., Nabicassa, M., Cassama, E., Houghton, J., Palmer, C.D., Pickering, H., Burton, M.J., Mabey, D.C., Bailey, R.L., Goodier, M.R., Holland, M.J., Roberts, C.H. (2016). Differential frequency of NKG2C/KLRC2 deletion in distinct African populations and susceptibility to Trachoma: a new method for imputation of KLRC2 genotypes from SNP genotyping data. *Hum Genet*, 135, 939–951.

Goodier, M.R., White, M.J., Darboe, A., Nielsen, C.M., Goncalves, A., Bottomley, C., Moore, S.E., Riley, E.M. (2014). Rapid NK cell differentiation in a population with near-universal human cytomegalovirus infection is attenuated by NKG2C deletions. *Blood*, 124(14), 2213-2222.

Groh, V., Brühl, A., El-Gabalawy, H., Nelson, J.L., Spies, T. (2003). Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *PNAS*, 100, 9452-9457

Gunturi, A., Berg, R.E., Forman, J. (2003). Preferential Survival of CD8 T and NK Cells Expressing High Levels of CD94. *The Journal of Immunology*, 170, 1737-1745.

Hayashi, T., Imai, K., Morishita, Y., Hayashi, I., Kusunoki, Y., Nakachi, K. (2006). Identification of the NKG2D Haplotypes Associated with Natural Cytotoxic Activity of Peripheral Blood Lymphocytes and Cancer Immunosurveillance. *Cancer Res*, 66(1), 563-570.

Hikami, K., Tsuchiya, N., Yabe, T., Tokunaga, K. (2003). Variations of human killer cell lectin-like receptors: common occurrence of NKG2-C deletion in the general population. *Genes and Immunity*, 4, 160-167.

Hizem, S., Mtiraoui, N., Massaoudi, S., Fortier, C., Boukouaci, W., Kahina, A., Charron, D., Mahjoub, T., Tamouza, R. (2014). Polymorphisms in Genes Coding for the NK-Cell Receptor NKG2D and its Ligand MICA in Recurrent Miscarriage. *American Journal of Reproductive Immunology*, 72, 577–585.

Imai, K., Hayashi, T., Yamaoka, M., Kajimura, J., Yoshida, K., Kusunoki, Y., Nakachi, K. (2012). Effects of NKG2D haplotypes on the cell surface expression of NKG2D protein on natural killer and CD8 T cells of peripheral blood among atomic-bomb survivors. *Human Immunology*, 73, 686-691.

- Iwaszko, M., Bogunia-Kubik, K. (2011). Clinical Significance of the HLA-E and CD94/NKG2 Interaction. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 59, 353–367.
- Iwaszko, M., Swierkot, J., Kolossa, K., Jeka, S., Wiland, P., Bogunia-Kubik, K. (2016). Influence of CD94 and NKG2A variants on susceptibility to rheumatoid arthritis and efficacy of anti-TNF treatment. *Joint Bone Spine*, 83, 75–79.
- Kabalak, G., Thomas, R.M., Martin, J., Ortego-Centeno, N., Jimenez-Alonso, J., de Ramón, E., Buyny, S., Hamsen, S., Gross, W.L., Schnarr, S., Zeidler, H., Gromnica-Ihle, E., Schmidt, R.E., Witte, T. (2010). Association of NKG2D gene variant with systemic lupus erythematosus in two populations. *Human Immunology* 71, 74-78.
- Lahiri, J.D.K., Nurnberger, J.I. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*, 19:5444.
- Li, L., Tian, W., Wang, W., Liu, K., Wang, J., Jin, H., Cai, J., Wang, J. (2015). NKG2C copy number variations in five distinct populations in mainland China and susceptibility to nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Human Immunology*, 76, 90-94.
- Ma, J., Guo, X., Wu, X., Li, J., Zhu, X., Li, Z., Li, J., Pan, L., Li, T., Li, H., Liu, Y. (2010). Association of NKG2D Genetic Polymorphism with Susceptibility to Chronic Hepatitis B in a Han Chinese Population. *Journal of Medical Virology*, 82, 1501–1507.
- Mariaselvam, C.M., Tamouza, R., Krishnamoorthy, R., Charron, D., Misra, D.P., Jain, V.K., Negi, V.S. (2016). Association of NKG2D gene variants with susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Immunology*, 187, 369-375.
- McInees, I.B., Schett, G. (2011). The pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *The New England Journal of Medicine* 365:2205-2219.
- Melum, E., Karlsen ,T.H., Schrupf, E., Bergquist, A., Thorsby, E., Boberg, K.M., Lie, B.A. (2008). Cholangiocarcinoma in Primary Sclerosing Cholangitis Is Associated with NKG2D Polymorphisms. *Hepatology*, 47(1), 90-96.
- Melum E., Buch, S., Schafmayer, C., Kalthoff, H., Tepel, J., Schreiber, S., Karlsen ,T.H., Hampe, J. (2008b), Investigation of cholangiocarcinoma associated NKG2D polymorphisms in colorectal carcinoma. *Int. J. Cancer*, 123, 241–242.
- Miyashita, R., Tsuchiya, N., Hikami, K., Kuroki, K., Fukazawa, T., Bijl, M., Kallenberg, C.G.M., Hashimoto, H., Yabe, T., Tokunaga, K. (2004). Molecular genetic analyses of human NKG2C (KLRC2) gene deletion. *International Immunology*, 16(1), 163-168.
- Moraru, M., Cañizares, M., Muntasell, A., de Pablo, R., López-Botet, M., Vilches, C. (2012), Assessment of copy-number variation in the NKG2C receptor gene in a single-tube and characterization of a reference cell panel, using standard polymerase chain reaction. *Tissue Antigens*, 80(2), 184-187.

Moraru, M., Cisneros, E., Gómez-Lozano, N., de Pablo, R., Portero, F., Cañizares, M., Vaquero, M., Roustán, G., Millán, I., López-Botet, M., Vilches, C. (2012b). Host Genetic Factors in Susceptibility to Herpes Simplex Type 1 Virus Infection: Contribution of Polymorphic Genes at the Interface of Innate and Adaptive Immunity. *J Immunol*, 188, 4412-4420.

Noyola, D.E., Fortuny, C., Muntasell, A., Noguera-Julian, A., Muñoz-Almagro, C., Alarcón, A., Juncosa, T., Moraru, M., Vilches, C., López-Botet, M. (2012). Influence of congenital human cytomegalovirus infection and the NKG2C genotype on NK-cell subset distribution in children. *Eur. J. Immunol*, 42, 3256–3266.

Park, K.S., Park, J.H., Song, Y.W. (2008). Inhibitory NKG2A and activating NKG2D and NKG2C natural killer cell receptor genes: susceptibility for rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens*, 72, 342-346.

Pegram, H.J., Andrews, D.M., Smyth, M.J., Darcy, P.K., Kershaw, M.H. (2011). Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunology and Cell Biology*, 89, 216–224.

Piotrowski, P., Lianeri, M., Olesinska, M., Jagodzinski, P.P. (2012). Prevalence of the NKG2D Thr72Ala polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep*, 39, 1343–1347.

Pope, R.M. (2002). Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews: Immunology*, 2, 527-535.

Rangel-Ramírez, V.V., Garcia-Sepulveda, C.A., Escalante-Padrón, F., Pérez-González, L.F., Rangel-Castilla, A., Aranda-Romo, S., Noyola, D.E. (2013). NKG2C gene deletion in the Mexican population and lack of association to respiratory viral infections. *International Journal of Immunogenetics*, 41, 126–130.

Roszak, A., Lianeri, M., Jagodzinski, P.P. (2012). Prevalence of the NKG2D Thr72Ala Polymorphism in Patients with Cervical Carcinoma. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 16 (8), 841-845.

Seo, J., Park, J.S., Nam, J.H., Bang, D., Sohn, S., Lee, E.S., Park, K.S. (2007). Association of CD94/NKG2A, CD94/NKG2C, and its ligand HLA-E polymorphisms with Behcet's disease. *Tissue Antigens*, 70, 307-313.

Synder, M.R., Weyand, C.M., Goronzy, J.J. (2004). The double life of NK receptors: stimulation or co-stimulation? *TRENDS in Immunology*, 25, 25-32.

Talledo, M., López, G., Huyghe, J.R., Verdonck, K., González, E., Clark, D., Vanham, G., Gotuzzo, E., Van Camp, G., Van Laer, L. (2012). Possible Implication of NFKB1A and NKG2D Genes in Susceptibility to HTLV-1-Associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis in Peruvian Patients Infected With HTLV-1. *Journal of Medical Virology*, 84, 319–326.

Taniguchi, R., Koyano, S., Suzutani, T., Goishi, K., Ito, Y., Morioka, I., Nakamura, H., Yamada, H., Oka, A., Inoue, N. (2015). A Thr72Ala polymorphism in the NKG2D gene

is associated with early symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *Infection*, 43, 353-359.

Thomas, R., Low, H.Z., Kniesch, K., Jacobs, R., Schmidt, R.E., Witte, T. (2012). NKG2C Deletion Is a Risk Factor of HIV Infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 28(8), 844-851.

Ucisik-Akkaya, E., Dorak, M.T. (2009). A study of natural killer cell lectin-like receptor K1 gene (KLRK1/NKG2D) region polymorphisms in a European population sample. *Tissue Antigens*, 73, 177–183.

Ucisik-Akkaya, E., Davis C.F., Do, T.N., Morrison, B.A., Stemmer, S.M., Amadio, W.J., Dorak, M.T. (2009). Examination of genetic polymorphisms in newborns for signatures of sex-specific prenatal selection. *Molecular Human Reproduction*, 16(10), 770–777.

van Bijen, S.T.A., Cossu, M., Preijers, F., Spanholtz, J., Dolstra, H., Radstake, T.R.D.J. (2011). Extensive natural killer cell receptor phenotyping on NK and T cells discloses differences in RA and PsA, potentially mirroring diverse immunoregulatory functions. *Journal of Translational Medicine* 9, 42.

Vilchez, J.R., Torres-Moreno, D., Martínez-Senac, M.M., Trujillo-Santos, J., Conesa-Zamora, P. (2013). Evaluation of the association of NKG2C copy number variations with susceptibility to human papillomavirus-induced cervical lesions. *Human Immunology*, 74, 1352-1356.

Zeng, X., Chen, H., Gupta, R., Paz-Altschul, O., Bowcock, A.M., Liao, W. (2013), Deletion of the Activating NKG2C Receptor and a Functional Polymorphism in its Ligand HLA-E in Psoriasis Susceptibility. *ExpDermatol*, 22(10), 1-7.

**Table 1. Characteristics of the studied population.**

| Characteristics                       | RA group<br>(n=376) | Control group<br>(n=322) | p                    |
|---------------------------------------|---------------------|--------------------------|----------------------|
| Female gender, n (%)                  | 307 (81.6%)         | 149 (46.3%)              | p<0.01 <sup>a</sup>  |
| Age, mean ( $\pm$ SD) <sup>#</sup>    | 46.3 ( $\pm$ 13.8)  | 41.9 ( $\pm$ 9.4)        | p<0.001 <sup>b</sup> |
| Smoke, n (%)                          | 94 (25.0%)          | -                        | -                    |
| Abusive alcohol consumption, n (%)    | 13 (3.5%)           | -                        | -                    |
| Erosions, n (%)                       | 308 (81.9%)         | -                        | -                    |
| Pannus, n (%)                         | 128 (34.0%)         | -                        | -                    |
| Extra articular manifestations, n (%) | 104/333 (31.2%)     | -                        | -                    |

n: sample number; RA: Rheumatoid Arthritis; <sup>#</sup>Age of RA group is represented by age at diagnosis; a:  $\chi^2$  test; b: Student's t-test.

**Table 2. NKG2 polymorphisms and RA susceptibility.**

|                           | RA group<br>n (%) | Control group<br>n (%) | O.R.  | C.I. (95%)  |
|---------------------------|-------------------|------------------------|-------|-------------|
| rs1049174                 |                   |                        |       |             |
| <i>NKG2D</i> C>G Genotype |                   |                        |       |             |
| CC                        | 170 (48%)         | 122 (45.5%)            | 1     | -           |
| CG                        | 150 (42.4%)       | 123 (45.9%)            | 0.875 | 0.63 - 1.22 |
| GG                        | 34 (9.6%)         | 23 (8.6%)              | 1.061 | 0.59 - 1.89 |
| <i>NKG2D</i> C>G Allele   |                   |                        |       |             |
| C                         | 490 (69%)         | 367 (68%)              |       |             |
| G                         | 218 (31%)         | 169 (32%)              |       |             |
| rs2255336                 |                   |                        |       |             |
| <i>NKG2D</i> G>A Genotype |                   |                        |       |             |
| GG                        | 234 (66.5%)       | 177 (66%)              | 1     | -           |
| GA                        | 102 (29%)         | 83 (31%)               | 0.930 | 0.66 - 1.32 |
| AA                        | 16 (4.5%)         | 8 (3%)                 | 1.513 | 0.63 - 3.61 |
| <i>NKG2D</i> G>A Allele   |                   |                        |       |             |
| G                         | 570 (81%)         | 437 (82%)              |       |             |
| A                         | 134 (19%)         | 99 (18%)               |       |             |
| rs2734440                 |                   |                        |       |             |
| <i>NKGA</i> A>G Genotype  |                   |                        |       |             |
| AA                        | 157 (45.2%)       | 106 (39.7%)            | 1     | -           |
| AG                        | 150 (43.2%)       | 128 (47.9%)            | 0.791 | 0.56 - 1.11 |
| GG                        | 40 (11.5%)        | 33 (12.4%)             | 0.818 | 0.49 - 1.38 |
| <i>NKG2A</i> A>G Allele   |                   |                        |       |             |
| A                         | 464 (67%)         | 340 (64%)              |       |             |
| G                         | 230 (33%)         | 194 (36%)              |       |             |
| <i>NKG2C</i> Genotype     |                   |                        |       |             |
| wt/wt                     | 252 (71.4%)       | 173 (70%)              | 1     | -           |
| wt/del                    | 85 (24.1%)        | 67 (27.1%)             | 0.871 | 0.60 - 1.27 |
| del/del                   | 16 (4.5%)         | 7 (2.8%)               | 1.569 | 0.63 - 3.89 |
| <i>NKG2C</i> Allele       |                   |                        |       |             |
| wt                        | 589 (83%)         | 413 (84%)              |       |             |
| del                       | 117 (17%)         | 81 (16%)               |       |             |

n: sample number; O.R.: Odds Ratio; C.I.: Confidence interval.

**Table 3. Influence of NKG2 polymorphisms on RA clinical manifestations and disease severity.**

| Polymorphism              | Extra articular manifestations<br>n (%) |             | <i>P</i> <sup>a</sup> | Secondary Sjögren's syndrome<br>n (%) |             | <i>P</i> <sup>a</sup> | DAS28 score<br>mean (±SD) | <i>P</i> <sup>b</sup> | Remission status<br>n (%) |            | <i>P</i> <sup>a</sup> |
|---------------------------|---|-------------|-----------------------|---------------------------------------|-------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|------------|-----------------------|
|                           | Presence                                | Absence     |                       | Presence                              | Absence     |                       |                           |                       | Presence                  | Absence    |                       |
| rs1049174                 |   |             |                       |                                       |             |                       |                           |                       |                           |            |                       |
| <i>NKG2D</i> C>G Genotype |   |             |                       |                                       |             |                       |                           |                       |                           |            |                       |
| CC                        | 50 (51.6%)                              | 107 (48.4%) |                       | 7 (53.8%)                             | 104 (48.8%) |                       | 5.29 (±1.52)              |                       | 77 (49.4%)                | 28 (45.2%) |                       |
| CG                        | 37 (38.1%)                              | 94 (42.5%)  | 0.76                  | 6 (46.2%)                             | 86 (40.4%)  | 0.46                  | 5.37 (±1.30)              | 0.75                  | 67 (42.9%)                | 25 (40.3%) | 0.30                  |
| GG                        | 10 (10.3%)                              | 20 (9.1%)   |                       | 0 (0%)                                | 23 (10.8%)  |                       | 5.50 (±1.53)              |                       | 12 (7.7%)                 | 9 (14.5%)  |                       |
| rs2255336                 |   |             |                       |                                       |             |                       |                           |                       |                           |            |                       |
| <i>NKG2D</i> G>A Genotype |   |             |                       |                                       |             |                       |                           |                       |                           |            |                       |
| GG                        | 66 (67.3%)                              | 147 (67.4%) |                       | 11 (84.6%)                            | 142 (66.7%) |                       | 5.36 (±1.42)              |                       | 109 (69.9%)               | 40 (64.5%) |                       |
| GA                        | 27 (27.6%)                              | 63 (28.9%)  | 0.83                  | 2 (15.4%)                             | 60 (28.2%)  | 0.37                  | 5.35 (±1.39)              | 0.99                  | 42 (26.9%)                | 16 (25.8%) | 0.14                  |
| AA                        | 5 (5.1%)                                | 8 (3.7%)    |                       | 0 (0%)                                | 11 (5.1%)   |                       | 5.31 (±2.01)              |                       | 5 (3.2%)                  | 6 (9.7%)   |                       |
| rs2734440                 |   |             |                       |                                       |             |                       |                           |                       |                           |            |                       |
| <i>NKGA</i> A>G Genotype  |   |             |                       |                                       |             |                       |                           |                       |                           |            |                       |
| AA                        | 43 (45.3%)                              | 97 (45.8%)  |                       | 5 (41.7%)                             | 93 (45.1%)  |                       | 5.18 (±1.31)              |                       | 66 (44%)                  | 26 (42.6%) |                       |
| AG                        | 40 (42.1%)                              | 91 (42.9%)  | 0.95                  | 7 (58.3%)                             | 85 (41.3%)  | 0.29                  | 5.57 (±1.51)              | 0.11                  | 66 (44%)                  | 27 (44.3%) | 0.97                  |
| GG                        | 12 (12.6%)                              | 24 (11.3%)  |                       | 0 (0%)                                | 28 (13.6%)  |                       | 5.30 (±1.57)              |                       | 18 (12%)                  | 8 (13.1%)  |                       |
| <i>NKG2C</i>              |   |             |                       |                                       |             |                       |                           |                       |                           |            |                       |
| <i>NKG2C</i> Genotype     |   |             |                       |                                       |             |                       |                           |                       |                           |            |                       |
| wt/wt                     | 67 (67.7%)                              | 161 (73.5%) |                       | 12 (92.3%)                            | 150 (70.1%) |                       | 5.39 (±1.42)              |                       | 113 (72%)                 | 43 (69.3%) |                       |
| wt/del                    | 28 (28.3%)                              | 48 (21.9%)  | 0.47                  | 1 (7.7%)                              | 53 (24.8%)  | 0.22                  | 5.25 (±1.40)              | 0.71                  | 38 (24.2%)                | 14 (22.6%) | 0.43                  |
| del/del                   | 4 (4.0%)                                | 10 (4.6%)   |                       | 0 (0%)                                | 11 (5.1%)   |                       | 5.14 (±1.97)              |                       | 6 (3.8%)                  | 5 (8.1%)   |                       |

n: sample number; a: Pearson's chi square test; b: ANOVA; DAS: disease activity score.

**Table 4. Literature review: *NKG2* polymorphisms and susceptibility to different diseases.**

| Reference                         | Context                          | Studied genes  | Sample   | Ethnicity/Population                    |
|-----------------------------------|----------------------------------|--|--|---|
| <b><i>Viral infections</i></b>    |                                  |  |  |   |
| Ma <i>et al.</i> 2010             | HBV                              | <i>CD94, NKG2A, NKG2D, NKG2F</i>   | 500 HBV-infected patients  | Asian (China)                           |
| Thomas <i>et al.</i> 2012         | HIV                              | <i>NKG2C</i>   | 433 HIV+ and 280 HIV-  | Caucasian (Germany)                     |
| Moraru <i>et al.</i> 2012b        | HSV-1                            | <i>KIR, NKG2C, HLA class I and II, FCGR2A, FCGR3A</i>  | 164 symptomatic patients and 138 asymptomatic subjects             | Caucasian (Spain)                       |
| Talledo <i>et al.</i> 2012        | HTLV-1                           | 45 genes, including <i>NKG2D</i>   | 141 HAM/TSP and 260 asymptomatic subjects                          | Andean/Mestizo (Peru)                   |
| Noyola <i>et al.</i> 2012         | HCMV                             | <i>NKG2C</i>   | 26 children with congenital CMV infection and 30 controls          | Caucasian (Spain)                       |
| Vilchez <i>et al.</i> 2013        | HPV                              | <i>NKG2C</i>   | 867 subjects: 263 LSIL, 309 HSIL and 295 controls                  | Caucasian (Spain)                       |
| Rangel-Ramírez <i>et al.</i> 2013 | respiratory viruses              | <i>NKG2C</i>   | 300 healthy donors; 61 subjects with RSV and 70 patients with H1N1 | Native American/Caucasian (Mexico)      |
| Goodier <i>et al.</i> 2014        | HCMV                             | <i>NKG2C</i>   | 191 African subjects   | African (Gambia)                        |
| Taniguchi <i>et al.</i> 2015      | HCMV                             | <i>NKG2D, MICA</i>   | 87 congenital CMV: 57 asymptomatic and 30 symptomatic              | Asian (Japan)                           |
| Asadi-Saghandi <i>et al.</i> 2016 | HCV                              | <i>NKG2D</i>   | 107 HCV-infected patients  | Asian (Iran)                            |
| <b><i>Autoimmunity</i></b>        |                                  |  |  |   |
| Hikami <i>et al.</i> 2003         | RA and SLE                       | <i>NKG2A, NKG2C, CD94</i>  | 201 RA, 123 SLE and 215 healthy individuals                        | Asian (Japan)                           |
| Miyashita <i>et al.</i> 2004      | RA and SLE                       | <i>NKG2C</i>   | 174 RA, 89 SLE and 155 healthy individuals                         | Asian/Caucasian (Japan and Netherlands) |
| Seo <i>et al.</i> 2007            | BD                               | <i>NKG2A, NKG2C, CD94</i>  | 345 BD patients and 368 healthy controls                           | Asian (Korea)                           |
| Park <i>et al.</i> 2008           | RA                               | <i>NKG2A, NKG2C, NKG2D</i>   | 210 RA and 298 healthy controls                                    | Asian (Korea)                           |
| Kabalak <i>et al.</i> 2010        | SLE                              | <i>NKG2D</i>   | 531 SLE and 667 healthy controls                                   | Caucasian (Germany and Spain)           |
| Piotrowski <i>et al.</i> 2012     | SLE                              | <i>NKG2D</i>   | 243 SLE and 502 healthy controls                                   | Caucasian (Poland)                      |
| Zeng <i>et al.</i> 2013           | Psoriasis                        | <i>NKG2C, HLA-E</i>  | 611 psoriasis cases and 493 healthy controls                       | Caucasian (NA)                          |
| Iwazko <i>et al.</i> 2016         | RA                               | <i>CD94, NKG2A</i>   | 284 RA and 124 healthy subjects                                    | Caucasian (Poland)                      |
| Mariaselvam <i>et al.</i> 2016    | RA                               | <i>NKG2D, NKG2A</i>  | 236 RA and 187 healthy controls                                    | Asian (Tamil South India)               |
| <b><i>Cancer</i></b>              |                                  |  |  |   |
| Li <i>et al.</i> 2015             | NPC                              | <i>NKG2C</i>   | 653 NPC patients and 1129 healthy controls                         | Asian (China)                           |
| Hayashi <i>et al.</i> 2006        | Cancer                           | <i>NKG2D, NKG2A</i>  | 102 cancer cases and 612 controls                                  | Asian (Japan)                           |
| Espinoza <i>et al.</i> 2016       | HPV-related cancer               | <i>NKG2D</i>   | 153 cervical cancer, 123 anogenital cancers; 206 healthy subjects  | Asian (Vietnam)                         |
| Furue <i>et al.</i> 2008          | Aerodigestive tract cancer       | <i>NKG2D</i>   | 502 patients with cancer and 1004 healthy controls                 | Asian (Japan)                           |
| Rozsak <i>et al.</i> 2012         | Cervical cancer                  | <i>NKG2D</i>   | 353 cervical cancer and 366 healthy women                          | Caucasian (Poland)                      |
| Melum <i>et al.</i> 2008b         | CRC                              | <i>NKG2D</i>   | 1072 CRC and 760 healthy controls                                  | Caucasian (Germany)                     |
| Melum <i>et al.</i> 2008          | CCA                              | <i>NKG2D, MICA</i>   | 365 CCA patients and 368 healthy controls                          | Caucasian (Norwegian)                   |
| <b><i>Miscellaneous</i></b>       |                                  |  |  |   |
| Imai <i>et al.</i> 2012           | Atomic bomb survivors            | <i>NKG2D, NKG2A</i>  | 732 atomic bomb survivors  | Asian (Japan)                           |
| Garrido <i>et al.</i> 2008        | Large granular lymphocytes (LGL) | <i>IL-10, CTLA-4, TNF-<math>\alpha</math>, FAS, RANTES, IL1-<math>\alpha</math>, FASL, NKG2D</i> | 81 LGL and 176 healthy controls.                                   | Caucasian (Spain)                       |
| Goncalves <i>et al.</i> 2016      | Trachomatous disease             | <i>NKG2C</i>   | 1522 subjects with and without TF or TS.                           | African <sup>a</sup>                    |
| Espinoza <i>et al.</i> 2009       | Transplant                       | <i>NKG2D</i>   | 145 pairs of unrelated donors-recipients of bone marrow            | Asian (Japan)                           |
| Hizem <i>et al.</i> 2014          | Recurrent miscarriage (RM)       | <i>NKG2D, NKG2A, MICA</i>  | 312 women with RM and 334 multiparous women                        | African (Tunisia)                       |
| Ucisik-Akkaya and Dorak 2009      | European population              | <i>NKG2D, NKG2F, NKG2A</i>   | 82 reference cell lines and 388 newborn samples                    | Caucasian (Europe)                      |



HBV: Hepatitis B virus; HIV: Human Immunodeficiency virus; HSV-1: Herpes simplex type 1 virus; HTLV-1: Human T lymphotropic virus type 1; HCMV: human cytomegalovirus; HPV: Human Papilloma virus; HCV: Hepatitis C virus; RSV: respiratory syncytial virus; HAM/TSP: HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis; LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesions; HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesions; RA: Rheumatoid Arthritis; SLE: Systemic Lupus Erythematosus; BD: Bechet's disease; NPC: nasopharyngeal carcinoma; CRC: colorectal cancer; CCA: cholangiocarcinoma

LGL: large granular lymphocytes; TF: trachomatous inflammation-follicular; TS: trachomatous scarring; RM: recurrent miscarriage; <sup>a</sup> African population studied from five distinct regions: Gambia, Kilimanjaro Region, Tanzania, Bijagos Archipelago in Guinea-Bissau

## CAPÍTULO 5

**Artigo original** “*Rheumatoid arthritis and apoptosis: investigating the role of apoptotic genes on disease susceptibility*”

Artigo em preparação para submissão ao periódico *Clinical Rheumatology*.

## **CAPÍTULO 5: ARTIGO ORIGINAL 2**

### **Rheumatoid Arthritis and Apoptosis: Investigating the role of apoptotic genes on disease susceptibility**

Maria Cristina Cotta Matte<sup>a</sup>, Nadine Glesse<sup>a</sup>, Rafael Tomoya Michita<sup>a</sup>, Claiton Viegas Brenol<sup>b</sup>, Ricardo Machado Xavier<sup>b</sup>, José Artur Bogo Chies<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

#### **Corresponding author**

José Artur Bogo Chies

#### *Permanent Address*

Department of Genetics

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves, 9500

Caixa Postal 15053

91501-970 Porto Alegre, RS

Brazil

Email address: jabchies@terra.com.br

**Keywords:** Rheumatoid arthritis, apoptosis, Fas, FasL, Bcl-2, p53.

### **Funding Information**

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: this work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank clinical support given by the medical professionals from the Rheumatology Division of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*.

## ABSTRACT

**Introduction:** The synovial hyperplasia and inflammatory infiltrate are the main characteristics of the Rheumatoid Arthritis (RA). These features might be the result of an unbalance between cellular proliferation and apoptosis levels. Several proteins are responsible for triggering or suppressing the intrinsic and extrinsic apoptosis pathways and therefore, contribute to RA pathogenesis. In this way, the apoptosis deregulation may be affected by polymorphic variants in apoptotic-related genes. **Method:** The present study we evaluated the relationship of *FAS*, *FASL*, *BCL-2* and *TP53* polymorphisms with RA susceptibility and disease severity. A total of 372 RA patients from the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* and 322 healthy controls from south of Brazil were included. All the polymorphisms were genotyped by PCR-RFLP. **Results:** Our results points to a possible influence of *FAS* -670 AA and *BCL-2* CC genotypes to RA susceptibility risk. In addition, *FAS* -1377 and *TP53* polymorphism was identified as disease severity markers. **Conclusions:** Considering our data we support the role of apoptotic-related genes in RA susceptibility and severity. Nevertheless, we suggest that further studies targeting the *FAS*-670, *BCL-2* -938, *FAS*-1377 and *TP53* Pro72Arg polymorphisms should be conducted in order to confirm our results.

## INTRODUCTION

Rheumatoid Arthritis (RA) is the most common type of autoimmune arthritis and affects 0.5 to 1% of the world population. It is a chronic, systemic and inflammatory disorder characterized by synovial hyperplasia. The persistent inflammation observed in the synovial membrane promotes an alteration of the synovial fibroblasts (SF) which become hyperplastic, invasive and acquire a high migratory potential that contribute to *pannus* formation. The *pannus* tissue infiltrates in the synovial joint layers causing bone erosion, cartilage destruction and joint deformation [1].

The disease etiology remains unclear, although published data support the hypothesis that the RA pathogenesis results from the unbalance between cellular proliferation and apoptosis process [2]. Programed cell death mechanism is essential for immunological tolerance, homeostasis and regulation of tissue composition. Apoptosis can be activated through extrinsic or intrinsic pathway. The first is initiated by the interaction of transmembrane Death Receptors (DR), which results in an activation of DISC (Death Initiation Signaling Complex). The latter is induced by the disruption of mitochondrial integrity by DNA damage by cytotoxic agents. After mitochondrial potential membrane loss, Cytochrome C is released in the cytoplasm of the cell. Both pathways converge to caspases pathway activation and thereafter promotes the apoptosis of the cell [3].

The apoptosis event is regulated by the interplay of several pro-apoptotic (as Fas, FasL, Bak, Bcl-x, Bok, BAD, BIK, Bid and Bim) and anti-apoptotic proteins (as Bcl-2, Bcl-xl and Bcl-w). Changes in the expression of these proteins could be involved in RA development or disease progression [4]. Cross-linking of Fas by Fas ligand (FasL) triggers apoptotic cell death via extrinsic pathway. In RA, synoviocytes and lymphocytes undergo Fas-mediated apoptosis *in vitro*, however low levels of apoptotic cells are observed *in vivo* [4, 5]. This fact might be explained by the elevated levels of the soluble forms of Fas and FasL (sFas and sFasL, respectively) found in the synovial fluid of RA patients. These molecules have been implicated in apoptosis inhibition, since, when bound to the membrane Fas or FasL forms, do not trigger apoptosis event [6]. Additionally, the expression the anti-apoptotic molecules as Bcl-2 in the synovial joints, contributes to enhance lymphocyte and SF survival [7].

The p53 tumor suppressor is also an important molecule that plays a central role in cell proliferation and death regulation. This molecule is largely known for its properties in the tumorigenesis process, therefore, it is suggested that elevated expression of p53 in

RA synovia might stimulate the growth of the synovial lining tissue and contribute to disease pathogenesis [8, 9]. All these findings support an important role of apoptotic factors on RA development. It is noteworthy that polymorphisms in the apoptotic genes may affect the expression of these molecules. However, few studies have addressed the impact of polymorphisms in genes that encode apoptosis proteins in RA susceptibility as well as clinical features, especially in European-derived populations. Thus, the aim of this study was investigate the influence of the polymorphisms rs2234767 (*FAS* -1377 G>A), rs1800682 (*FAS* -670 A>G), rs763110 (*FASL* -844 T>C), rs5030772 (*FASL* *inv2nt*\_124 A>G), rs2279115 (*BCL-2* -938 C>A), rs1042522 (*TP53* Pro72Arg) in RA susceptibility and disease severity in a population from the South of Brazil.

## MATERIALS AND METHODS

### *Study population*

For this case-control study, 372 RA patients and 322 healthy control subjects were selected. Only Caucasian subjects were included. RA patients were recruited from the Division of Rheumatology at *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA, Porto Alegre, Brazil) and were diagnosed according to the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria for RA [10]. Clinical and laboratory data of RA patients, as rheumatoid factor, bone erosions, extra articular manifestations, comorbidities, smoke, abusive alcohol consumption and disease activity score (DAS28) were collected from medical records. The presence of anti-citrullinated protein antibodies was not explored in our analysis since only 64/372 patients had this information available in their medical charts. The control group was composed of healthy blood donor individuals without autoimmune disease history, as registered in a standard questionnaire. All participants signed written informed consent. The study protocol was approved by the Medical Ethics Committee of the involved institutions (CAAE 52996015.6.0000.5327).

### *DNA Extraction and Genotyping*

Total DNA extraction from blood samples was performed as described by Lahiri and Nurnberger [11]. Six polymorphisms located within apoptosis genes were selected for this study: *FAS* -1377 G>A (rs2234767) and -670 A>G (rs1800682); *FASL* -844 T>C (rs763110) and *Inv2nt*124 A>G (rs5030772); *BCL-2* -938 C>A (rs2279115); and *TP53*

Pro72Arg (rs1042522). Molecular identification of these genetic variants was performed by polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism assay (RFLP) accordingly to previous protocols described in the literature [12–15].

#### *Statistical Analysis*

Genotypic and allelic frequencies were estimated through direct counting. The agreement of genotype frequencies with Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) expectations was tested using Pearson chi-squared ( $\chi^2$ ) test. Comparisons of genotype and allelic frequencies between groups were done using  $\chi^2$  test. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI) were calculated to assess the relative risk conferred by a specific allele or genotype in RA susceptibility. Comparisons of DAS28 mean among the genotypes and alleles were performed using ANOVA or T-student test when appropriated. Haplotype and linkage disequilibrium (LD) analysis between the *FAS* polymorphisms was performed using Haploview version 4.2 [16] and PHASE version 2.1 [17]. All statistical analyses were performed with IBM SPSS Statistics for Windows, version 18.0 (IBM Corp, Armonk, NY) and  $p < 0.05$  was considered to indicate statistical significance.

## RESULTS

In this case-control study, we evaluated 372 RA patients and 322 healthy controls. A significant higher frequency of female sex was observed in RA group (81.5%) compared to control group (46.3%) ( $p < 0.001$ ). The mean age at diagnosis of RA patients was  $46.3 \pm 13.8$ , whereas the mean age of the control group was  $41.9 \pm 9.4$  ( $p < 0.001$ ). Considering these differences between RA patients and healthy controls, these variables were included in multivariate logistic regression model. The clinical, demographic and laboratory features of RA patients are shown in Table 1. Within RA group, 31.5% had extra-articular manifestations, being rheumatoid nodules the most frequent manifestations observed in our sample (24%). Other manifestations as vasculitis, felty's syndrome, episcleritis, pneumonitis and pericarditis showed frequencies below 5%.

RA severity was accessed through the analysis of DAS28 score, Rheumatoid factor (RF) positivity and the presence of extra-articular manifestations. The highest DAS28 measure registered in medical charts throughout RA patients clinical follow-up was used as disease severity marker.



All the polymorphisms analyzed were in HWE, except for the *FASL* -844 C>T, which showed deviation from the expected frequencies only in the control group. For *FAS* -1377 G>A polymorphism there was no significant difference between the groups in terms of genotypic and allelic distribution (Table 2). No significant association was found when the genotypes frequencies were compared between seropositive RA (positive RF) and seronegative RA (negative RF) patients, and between the presence and absence of extra articular manifestations. Similar results were found when alleles were investigated (data not shown). Patients carrying *FAS* -1377 GG genotype showed higher DAS28 measure compared to patients carrying GA and AA genotypes ( $p=0.05$ ). When GG genotype was compared to A allele a significant difference in DAS28 values was observed ( $5.47\pm 1.50$  for GG genotype;  $5.03\pm 1.38$  for A allele;  $p=0.014$ ) (Table 4).

Concerning the *FAS* -670 A>G polymorphism, AA genotype frequency was significantly higher in RA group compared to control group (29.7% vs 20.7% residual  $p=0.010$ ) (Table 2). Also, RA group showed higher A allele frequency compared to control group (53.1% vs 47.4%, respectively;  $p=0.043$ ) (Table 2). Additionally, the AA genotype seems to be a risk factor for RA development (OR 1.587, 95% CI 1.02 – 2.48). In multivariate logistic regression analysis, no influence of this polymorphism on RA susceptibility was observed (Table 3). When DAS28 score, RF positivity and presence of extra articular manifestations were evaluated (Table 4), no influence was found.

At the haplotype level, no significant differences in *FAS* haplotypes frequencies were observed between RA patients and control subjects (Table 5). When diplotypes were analyzed, we observed a higher frequency of the diplotype GA/GA (derived from the combination of *FAS* -1377 GG and -670 AA) in RA patients compared to control subjects, although the frequencies did not show statistical significant differences (Table 5).

*FAS* ligand polymorphisms *FASL* -844 C>T and *inv2nt\_124* A>G did not demonstrate a significant difference in genotypic or allelic distributions between groups (Table 2). Moreover, these genetic variants did not reveal an influence on disease activity or severity (Table 4). Considering that *FASL* -844 C>T genotype frequencies were not in HWE in the control group, no further comparisons, as haplotype analyses were performed.

For the *BCL-2* -938 C>A polymorphism, the CC genotype showed a higher frequency in RA group compared to controls (26.8% vs 17.6% respectively; residual  $p=0.008$ ) (Table 2). Moreover, individuals carrying CC genotype showed a 1.71-fold increased risk for RA development (95% CI 1.15 – 2.54) compared to CA+AA genotypes.

No significant influence was found in multivariate logistic regression model (Table 3), as well as, no influence on disease severity was observed for this polymorphism (Table 4).

Finally, *TP53* polymorphism genotypes and alleles did not show any significant influence considering RA susceptibility (Table 2). However, the presence of CC genotype and C allele might be associated to a worst disease severity. Patients carrying CC genotype displayed higher DAS28 means in comparison to those carrying CG or GG genotypes ( $p=0.004$ ). Moreover, patients carrying C allele showed higher DAS28 values compared to those carrying GG genotype ( $P=0.003$ ) (Table 4).

## DISCUSSION

Rheumatoid arthritis is a chronic autoimmune disease characterized by an inflammation of the synovial joints that leads to cartilage and bone tissues damage [2]. This autoimmune disorder is more prevalent among women than men [1], which explain the higher frequency of female gender observed in our study sample. Impaired cellular apoptosis appears to be an important underlying process that contribute to cellular hyperplasia and inflammation exacerbation in the synovial joint [2]. The present study investigated the influence of six polymorphisms distributed in genes encoding molecules involved in the apoptosis pathway (*FAS*, *FASL*, *BCL-2* and *TP53*). We observed an influence of *FAS* -670 AA genotype and *BCL-2* -938 CC genotype on RA susceptibility and, *FAS* -1377 GG and *TP53* CC in disease severity.

Conflicting results have been reported in the literature considering the impact of *FAS* and *FASL* polymorphisms on RA susceptibility and disease activity [18–20]. Considering the *FAS* gene, the two major polymorphisms located in the 5' flanking region of the gene were first described by Huang *et al.*, 1997: *FAS* -1377 G>A located at the silencer region and *FAS* -670 A>G located at the enhancer region [21]. For *FAS* -1377 G>A, the presence of GA/AA genotypes were previously associated to high RA risk and disease severity ( $DAS28 \geq 3.20$ ) in a Chinese population [22]. A meta-analysis conducted by Lee *et al.*, [23] did not find an association of this variant with RA risk, but reported a significant association between *FAS* -1377A and systemic lupus erythematosus (SLE) susceptibility. Similar to these results, we did not observe a significant association between *FAS* -1377 G>A polymorphism and RA development, although we did find a potential role of this polymorphism in disease severity. RA patients carrying GG genotype showed significant higher DAS28 measure compared to patients carrying A allele.

In a recent study conducted by our research group including SLE patients, no influence of *FAS* -1377 or *FAS* -670 polymorphisms in disease susceptibility were observed [24]. In the same meta-analysis aforementioned [23], *FAS* -670 GG+GA combined genotypes was associated to rheumatic diseases (SLE and RA) development in Asian sample group, but not in European population. However, in a recent analysis [20] including results from six published articles, no association between RA and *FAS* -670 was found, even when stratification by ethnicity was performed. In the present study, a significant association of *FAS* -670 AA genotype and RA risk was found suggesting that this polymorphism could be an important genetic factor for disease susceptibility. The A allele, leads to enhanced binding STAT1 factor and is associated to a higher transcriptional activity compared to G allele. Furthermore, AA genotype was associated to higher soluble Fas (sFas) levels, which in turns, is observed in synovial fluid of RA subjects and have been implicated to apoptosis inhibition [25, 26]. The expression of the soluble isoform of Fas downregulates the expression of its respective membrane form (mFas). In addition, it modifies ligand (FasL) concentration and inhibits mFasL-mFas interaction in the extracellular space. Consequently, the induction of apoptosis is blocked [6].

One of the most studied polymorphisms in *FASL* gene is rs763110 (-844 C>T) [18, 27]. A significant RA risk for T allele and TT genotype have already been reported [19], whereas other studies failed to show a significant association [18, 22, 27]. In our study, no influence of *FASL* -844 C>T polymorphism was observed for RA susceptibility or disease severity. However, the fact that the genotype frequency of the control group were not in HWE hinders further extrapolations about this variant. In addition, no influence of *FASL* *inv2nt*\_124 A>G polymorphism was observed for RA susceptibility or disease severity, in agreement to the results reported in a Iranian population [18]. In contrast, *FASL* *inv2nt*\_124 AA genotype frequency was 3.4-fold higher in RA group compared to control group in Caucasians subject from Turkey [19].

The -844 C>T polymorphism is located in a binding motif for the CAAT/enhancer  $\beta$  transcription factor, being the C allele responsible for a higher expression of FasL compared to T allele [18, 28]. The higher frequency of the T allele among RA patients reduce the expression of FasL in patients with RA and may inhibit the apoptotic activity of the Fas–FasL pathway [19]. In contrast, besides FasL role in extrinsic pathway activation, higher levels of the FasL soluble form (sFasL) have been described in the synovial fluid or serum of RA patients. Contrary to its respective membrane form (mFasL), sFasL display non-apoptotic features, once when bounded to membrane Fas

receptor do not trigger apoptosis events [25, 29, 30]. In other autoimmune diseases, as systemic lupus erythematosus (SLE), the presence of *FASL* -844 CC genotype and C allele have been associated to SLE risk [24, 28]. As aforementioned, -844C is related to high FasL expression [26]. Since apoptotic cells are the major source of autoantigens production in SLE pathogenesis, high FasL expression could contribute to increased apoptosis events and to the breakdown of immunological tolerance observed in SLE [24].

B cell lymphoma-2 (Bcl-2) is an important oncogenes involved in apoptosis intrinsic pathway regulation. Currently research shows that Bcl-2 function abnormalities and genetic variations might be associated to cancer development [31, 32]. In RA, a destructive tissue known as *pannus* grows adjacently to the joint space promoting bone erosion and cartilage destruction. The changes observed in the synovia resemble typical features of transformed cells [2]. It has been hypothesized that elevated expression of Bcl-2 results in low apoptosis rates observed in lymphocytes and fibroblast-like synoviocytes of RA patients [33, 34] and could contribute therefore to *pannus* development. However, opposite results about Bcl-2 expression in RA synovia have been described [35]. Albeit its importance in apoptosis pathway regulation, little is known about the influence of Bcl-2 polymorphisms in RA susceptibility and disease severity. One study conducted by Zhu *et al.*, [22] observed a significant influence of *BCL-2* rs17757541 and the risk of RA. Our study investigated a different polymorphism in *BCL-2* (rs2279115), located in the promoter region of the gene, which have been extensively associated to cancer risk [36–38]. We observed a RA risk for CC genotype (OR 1.710 95% CI 1.15-2.54) compared to A allele. No influence of *BCL-2* -938 in disease severity was found. The C allele was previously associated to lower expression of Bcl-2 compared to A allele [37], which might explain the lack difference in Bcl-2 expression in RA synovia compared to osteoarthritis patients [39].

To assess the RA risk, odds ratio analysis was performed for *FAS* -670 and *BCL-2* -938 polymorphisms. When the analysis included sex and gender as co-variables, the significances were lost. However, considering the significant physiological impact of these molecules in RA pathogenesis, as described previously, results obtained from univariate regression model should not be ignored.

The role of p53 in RA is not completely understood. Both an overexpression of P53 protein and the presence of several *TP53* mutations have been described in the rheumatoid synovium [9, 40]. In the *TP53* gene, the polymorphism Pro72Arg polymorphism directly affects the apoptosis levels. The presence of Arginine amino acid

at 72 position is more efficient to induce apoptosis compared to the Pro72 variant [41]. Despite its clear importance in protein function, this polymorphism was not associated to RA risk development [42–44]. A meta-analysis conducted by Lee *et al.*, [45] evaluated ten studies (4 RA and 6 SLE studies) in populations with distinct ethnicities and did not report an association of *TP53* polymorphism and RA or SLE development risk when the total sample was analyzed. However, association of C allele and SLE and RA were detected in Asians [45]. Our results are in accordance to those previous findings of the literature regarding the role of *TP53* on disease susceptibility however, we reported a role of *TP53* polymorphism with RA severity, since patients carrying CC genotype (Pro/Pro) and C allele showed higher DAS28 levels in comparison to those carrying other genotypes. A previous study in a Italian population observed an association between *TP53* Pro/Pro genotype and the development of joint erosions [44].

Apoptosis is a remarkably process involved on RA pathogenesis. Although its importance, few studies have explored the relationship of apoptotic genes polymorphisms and RA susceptibility. In summary, our results points to *FAS* -670 C>T and *BCL-2* -938 C>A on RA susceptibility, and *FAS* -1377 and *TP53* polymorphism were identified as a marker for disease severity. The differences between our results and previous published data might be related to sample ethnicity, since only few studies included Caucasian subjects. In addition, the Brazilian population has a high level of miscegenation, which may result in a unique genetic profile of this population. Some limitations exist for the interpretation of the data found in the present study. RA is a multifactorial disorder characterized by the influence of several genetic and environmental factors, being each factor responsible for a small contribution to disease susceptibility. With this in mind, we chose to not apply a statistical correction for multiple comparisons since the use of such a stringent method could mask the potential contributions of the studied polymorphisms to disease susceptibility or severity. Nevertheless, considering that some of the associations found are being described for the first time, we suggest that further studies targeting the *FAS*-670, *BCL-2* -938, *FAS* -1377 and *TP53* Pro72Arg polymorphisms should be conducted in order to confirm our results.

## REFERENCES

1. McInnes I (2011) The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 365:2205–19
2. Pope RM (2002) Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2:527–35 . doi: 10.1038/nri846
3. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, et al (2012) Role of Apoptosis in disease.pdf. *Aging (Albany NY)* 4:330–349
4. Salmon M, Scheel-Toellner D, Huissoon AP, et al (1997) Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium. *J Clin Invest* 99:439–446 . doi: 10.1172/JCI119178
5. Firestein GS, Yeo M, Zvaifler NJ (1995) Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. *J Clin Invest* 96:1631–8 . doi: 10.1172/JCI118202
6. Cheng J, Zhou T, Liu C, et al (1994) Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science (80- )* 263:1759–1762 . doi: 10.1126/science.7510905
7. Lee S-Y, Kwok S-K, Son H-J, et al (2013) IL-17-mediated Bcl-2 expression regulates survival of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis through STAT3 activation. *Arthritis Res Ther* 15:R31 . doi: 10.1186/ar4179
8. Brown JM, Attardi LD (2005) The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* 5:1–8
9. Firestein GS, Nguyen K, Aupperle KR, et al (1996) Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 149:2143–51 . doi: 10.1172/JCI118202
10. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al (2010) 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 62:2569–2581 . doi: 10.1002/art.27584
11. Lahiri DK, Nurnberger JI J (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444
12. Zhang N, Li X, Tao K, et al (2011) BCL-2 (-938C>A ) polymorphism is associated with breast cancer susceptibility. *BMC Med Genet* 12:48 . doi:

10.1186/1471-2350-12-48

13. Zhang Z, Wang L, Sturgis EM, et al (2006) Cancer Susceptibility and Prevention 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* 12:5596–5603 . doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1739
14. T. Sun, X. Miao, X. Zhang, W. Tan, P. Xiong DL (2004) Polymorphisms of death pathway genes FAS and FASL in esophageal squamous-cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 96:1030–1036
15. Shen H, Liu Z, Strom SS, et al (2003) p53 Codon 72 Arg Homozygotes Are Associated with an Increased Risk of Cutaneous Melanoma. *J Invest Dermatol* 121:1510–1514 . doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12648.x
16. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview : analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263–265 . doi: 10.1093/bioinformatics/bth457
17. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction from Population Data. *Am J Hum Genet* 68:978–989
18. Mohammadzadeh A, Pourfathollah AA, Tahoori MT, et al (2012) Evaluation of apoptosis-related gene Fas ( CD95 ) and FasL ( CD178 ) polymorphisms in Iranian rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int* 32:2833–2836 . doi: 10.1007/s00296-011-2065-x
19. Yıldır S, Sezgin M, Erdal ME (2013) Relation of the Fas and FasL gene polymorphisms with susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 33:2637–2645 . doi: 10.1007/s00296-013-2793-1
20. Lee YH, Bae SC, Song GG (2015) Association between the CTLA-4, CD226, FAS polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility: A meta-analysis. *Hum Immunol* 76:83–89 . doi: 10.1016/j.humimm.2015.01.023
21. Huang QR, Morris D, Manolios N (1997) Identification and characterisation of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. *Mol Immunol* 34:577–582 . doi: 10.1016/S0161-5890(97)00081-3
22. Zhu A, Wang M, Zhou G, et al (2016) Fas/FasL, Bcl2 and Caspase-8 gene polymorphisms in Chinese patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 36:807–818 . doi: 10.1007/s00296-016-3443-1

23. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, et al (2012) Associations between the FAS -670 A/G and -1,377 G/A polymorphisms and susceptibility to autoimmune rheumatic diseases: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 1–9 . doi: 10.1007/s11033-012-1957-5
24. Glesse N, Vianna P, Paim LMG, et al (2017) Evaluation of polymorphic variants in apoptotic genes and their role in susceptibility and clinical progression to systemic lupus erythematosus. *Lupus* 26:746–755 . doi: 10.1177/0961203316678671
25. Hong S, Kim EJ, Lee EJ, et al (2015) TNF- $\alpha$  confers resistance to Fas-mediated apoptosis in rheumatoid arthritis through the induction of soluble Fas. *Life Sci* 122:37–41 . doi: 10.1016/j.lfs.2014.12.008
26. Treviño-Talavera BA, Palafox-Sánchez CA, Muñoz-Valle JF, et al (2014) FAS -670A > G promoter polymorphism is associated with soluble Fas levels in primary Sjögren ' s syndrome. *Genet Mol Res* 13:4831–4838
27. Kobak S, Berdeli A (2012) Fas/FasL promoter gene polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. *Reumatismo* 64:374–379
28. Wu J, Metz C, Xu X, et al (2017) 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 . doi: 10.4049/jimmunol.170.1.132
29. Audo R, Calmon-Hamaty F, Papon L, et al (2014) Distinct effects of soluble and membrane bound Fas ligand on fibroblast-like synoviocytes from Rheumatoid Arthritis patients. *Arthritis Rheum.* doi: 10.1002/art.38806
30. Hashimoto H, Tanaka M, Suda T, et al (1998) Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 41:657–662 . doi: 10.1002/1529-0131(199804)41:4<657::aid-art12>3.0.co;2-n
31. Zhang X, Weng W, Xu W, et al (2014) Role of Bcl-2 -938 C . A polymorphism in susceptibility and prognosis of cancer: a meta-analysis. 2–8 . doi: 10.1038/srep07241
32. Künkele A, Grosse-Lordemann A, Schramm A, et al (2013) The BCL2-938 C > A promoter polymorphism is associated with risk group classification in children with acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer* 13: . doi: 10.1186/1471-2407-13-452



33. Van Der Geest KSM, Smigielska-Czepiel K, Park JA, et al (2014) SF treg cells transcribing high levels of Bcl-2 and microRNA-21 demonstrate limited apoptosis in RA. *Rheumatol (United Kingdom)* 54:950–958 . doi: 10.1093/rheumatology/keu407
34. Schirmer M, Vallejo AN, Weyand CM, et al (1998) Resistance to Apoptosis and Elevated Expression of Bcl-2 in Clonally Expanded CD4+CD28– T Cells from Rheumatoid Arthritis Patients. *J Immunol* 161:1018–1025
35. Chou CT, Yang JS, Lee MR (2001) Apoptosis in rheumatoid arthritis - Expression of Fas, Fas-L, p53, and Bcl-2 in rheumatoid synovial tissues. *J Pathol* 193:110–116 . doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH746>3.0.CO;2-K
36. Renner W, Langsenlehner U, Krenn-Pilko S, et al (2017) BCL2 genotypes and prostate cancer survival. *Strahlentherapie und Onkol* 193:466–471 . doi: 10.1007/s00066-017-1126-9
37. Meka PB, Jarjapu S, Vishwakarma SK, et al (2016) Influence of BCL2-938 C>A promoter polymorphism and BCL2 gene expression on the progression of breast cancer. *Tumor Biol* 37:6905–6912 . doi: 10.1007/s13277-015-4554-0
38. Javid J, Mir R, Mirza M, et al (2015) CC genotype of anti-apoptotic gene BCL-2 (-938 C/A) is an independent prognostic marker of unfavorable clinical outcome in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Transl Oncol* 17:289–295 . doi: 10.1007/s12094-014-1226-2
39. Isomäki P, Söderström KO, Punnonen J, et al (1996) Expression of bcl-2 in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 35:611–9
40. Yamanishi Y, Boyle DL, Rosengren S, et al (2002) Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10025–30 . doi: 10.1073/pnas.152333199
41. Dumont P, Leu JI, Della AC, et al (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33:357–365 . doi: 10.1038/ng1093
42. Moodley D, Mody G, Chuturgoon A (2010) Functional analysis of the p53 codon 72 polymorphism in black South Africans with rheumatoid arthritis—a pilot study. *Clin Rheumatol* 1099–1105 . doi: 10.1007/s10067-010-1505-4

43. Assmann G, Voswinkel J, Mueller M, et al (2009) Association of rheumatoid arthritis with Mdm2 SNP309 and genetic evidence for an allele-specific interaction between MDM2 and p53 P72R variants: a case control study. *Clin Exp Rheumatol* 27:615–9
44. Macchioni P, Nicoli D, Casali B, et al (2007) The codon 72 polymorphic variants of p53 in Italian rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 25:416–421
45. Lee YH, Bae SC, Choi SJ, et al (2012) Associations between the p53 codon 72 polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Lupus* 21:430–437 . doi: 10.1177/0961203311434941

**Table 1. Demographic, clinical and laboratorial features of RA patients**

| Characteristics                             | RA group<br>(n = 372) |
|---|-----------------------|
| Female gender                               | 303 (81.5%)           |
| Age at diagnosis (years)                    | 46.3 ( $\pm$ 13.8)    |
| Smoke                                       | 94/157 (25.3%)        |
| Abusive alcohol consumption                 | 13/104 (3.5%)         |
| Erosions                                    | 308 (81.9%)           |
| Pannus                                      | 128 (34.0%)           |
| DAS28 score                                 | 4.83 ( $\pm$ 1.72)    |
| Extra articular manifestations              | 104/330 (31.5%)       |
| Rheumatoid nodule                           | 79/330 (23.9%)        |
| Atlantoaxial Subluxation                    | 55/330 (16.7%)        |
| Secondary Sjögren Syndrome                  | 17/330 (7.1%)         |
| Osteoporosis                                | 104/240 (43.3%)       |
| Rheumatoid factor (RF) positivity           | 295 (87%)             |
| Anti-citrullinated protein antibody (ACPA)  | 64 (17.2%)            |
| Antinuclear antibody (ANA)                  | 37 (22.8%)            |
| Anti-extractable nuclear antigen (anti-ENA) | 6 (5.6%)              |
| Anti-DNA                                    | 2 (2.8%)              |
| Viral infections                            | 5 (6.7%)              |

n, sample number; RA: Rheumatoid Arthritis; SD: standard deviation  
Frequencies are represented as n (%). Age at diagnosis (years) and DAS28 score are represented as mean ( $\pm$ SD).

**Table 2. Genotypic and allelic frequencies of the studied polymorphisms between RA patients and controls.**

|  | RA<br>n (%) | Controls<br>n (%) | <i>p</i>           |
|--|-------------|-------------------|--------------------|
| <i>rs2234767 FAS -1377 G&gt;A Genotype</i>       |             |                   |                    |
| GG   | 250 (69.6)  | 204 (71.3)        |                    |
| GA   | 97 (27.0)   | 77 (26.6)         | ns                 |
| AA   | 12 (3.3)    | 5 (1.7)           |                    |
| <i>FAS-1377 G&gt;A Allele</i>                    |             |                   |                    |
| G  | 597 (83.1)  | 485 (84.8)        |                    |
| A  | 121 (16.9)  | 87 (15.2)         | ns                 |
| <i>rs1800682 FAS -670 A&gt;G Genotype</i>        |             |                   |                    |
| AA   | 105 (29.7)  | 59 (20.7)         |                    |
| AG   | 166 (46.9)  | 152 (53.3)        | 0.010 <sup>b</sup> |
| GG   | 83 (23.4)   | 74 (26.0)         |                    |
| <i>FAS-670 A&gt;G Allele</i>                     |             |                   |                    |
| A  | 376 (53.1)  | 270 (47.4)        |                    |
| G  | 332 (46.9)  | 300 (52.6)        | 0.043 <sup>a</sup> |
| <i>rs763110 FASL -844 C&gt;T Genotype</i>        |             |                   |                    |
| CC   | 118 (33.5)  | 116 (40.8)        |                    |
| CT   | 167 (47.5)  | 113 (39.8)        | na                 |
| TT   | 67 (19.0)   | 55 (19.4)         |                    |
| <i>FASL -844 T&gt;C Allele</i>                   |             |                   |                    |
| C  | 403 (57.2)  | 345 (60.7)        |                    |
| T  | 301 (42.8)  | 223 (39.3)        | na                 |
| <i>rs5030772 FASL inv2nt_124 A&gt;G Genotype</i> |             |                   |                    |
| AA   | 270 (76.7)  | 210 (75.5)        |                    |
| AG   | 74 (21.0)   | 65 (23.4)         | ns                 |
| GG   | 8 (2.3)     | 3 (1.1)           |                    |
| <i>FASL inv2nt_124A&gt;G Allele</i>              |             |                   |                    |
| A  | 614 (87.2)  | 485 (87.2)        |                    |
| G  | 90 (12.8)   | 71 (12.8)         | ns                 |
| <i>rs2279115 BCL-2 -938 C&gt;A Genotype</i>      |             |                   |                    |
| CC   | 94 (26.8)   | 46 (17.6)         |                    |
| CA   | 172 (49.0)  | 141 (54.0)        | 0.008 <sup>b</sup> |
| AA   | 85 (24.2)   | 74 (28.4)         |                    |
| <i>BCL-2 -938 C&gt;A Allele</i>                  |             |                   |                    |
| C  | 360 (51.3)  | 233 (44.6)        |                    |
| A  | 342 (48.7)  | 289 (55.4)        | 0.024 <sup>a</sup> |
| <i>rs1042522 TP53 Pro72Arg (C&gt;G) Genotype</i> |             |                   |                    |
| CC   | 33 (9.5)    | 24 (8.9)          |                    |
| CG   | 134 (38.7)  | 104 (38.5)        | ns                 |
| GG   | 179 (51.7)  | 142 (52.6)        |                    |
| <i>TP53 Pro72Arg Allele</i>                      |             |                   |                    |
| C  | 200 (28.9)  | 152 (28.1)        |                    |
| G  | 492 (71.1)  | 388 (71.9)        | ns                 |

RA: rheumatoid arthritis; <sup>a</sup>Pearson's chi square test; <sup>b</sup>Residual *p*  
ns: not significant. na: not applicable (genotypic frequencies were not in HWE).

**Table 3. Univariate and Multivariate Logistic Regression Analysis of *FAS* -670 A>G and *BCL-2* -938 C>A polymorphisms.**

|                                 |         | Univariate model |               |          | Multivariate model <sup>a</sup> |               |          |
|---------------------------------|---------|------------------|---------------|----------|---------------------------------|---------------|----------|
|                                 |         | OR               | 95% CI        | <i>p</i> | OR                              | 95% CI        | <i>p</i> |
| <i>rs1800682 FAS</i> -670 A>G   | AA      | 1.587            | (1.02 – 2.48) | 0.043*   | 1.378                           | (0.83 – 2.29) | 0.211    |
|                                 | AG      | 0.974            | (0.66 – 1.43) | 0.891    | 0.970                           | (0.63 – 1.49) | 0.890    |
|                                 | GG      | 1                | -             |          | 1                               | -             |          |
| <i>rs2279115 BCL-2</i> -938 C>A | AA      | 1.615            | (1.12 – 2.33) | 0.010*   | 1.406                           | (0.93 – 2.12) | 0.105    |
|                                 | GG + GA | 1                | -             |          | 1                               | -             |          |
|                                 | CC      | 1.779            | (1.11 – 2.85) | 0.016*   | 1.591                           | (0.94 – 2.69) | 0.084    |
|                                 | CA      | 1.062            | (0.72 – 1.56) | 0.758    | 1.236                           | (0.80 – 1.90) | 0.335    |
|                                 | AA      | 1                | -             |          | 1                               | -             |          |
|                                 | CC      | 1.710            | (1.15 – 2.54) | 0.008*   | 1.383                           | (0.89 – 2.15) | 0.151    |
|                                 | CA + AA | 1                | -             |          | 1                               | -             |          |

OR, Odds Ratio; CI, confidence interval; \**p*<0.05<sup>a</sup> OR analysis controlled by gender and age.

**Table 4. Influence of apoptosis polymorphisms on RA clinical manifestations and disease severity**

|   | Extra articular manifestations |                  | <i>P</i> <sup>a</sup> | Rheumatoid Factor (RF) |                  | <i>P</i> <sup>a</sup> | DAS28 score<br>Mean (±SD) | <i>P</i> <sup>b</sup> |
|---|--------------------------------|------------------|-----------------------|------------------------|------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
|   | Presence<br>n (%)              | Absence<br>n (%) |                       | Presence<br>n (%)      | Absence<br>n (%) |                       |                           |                       |
| <i>rs2234767 FAS -1377 G&gt;A</i>       |                                |                  |                       |                        |                  |                       |                           |                       |
| GG                                      | 73 (70.2)                      | 148 (67.0)       |                       | 198 (68.0)             | 28 (66.7)        |                       | 5.47 (±1.50)              |                       |
| GA                                      | 30 (28.8)                      | 62 (28.1)        | 0.449                 | 82 (28.2)              | 13 (31.0)        | 0.857                 | 5.02 (±1.38)              | 0.05                  |
| AA                                      | 1 (1.0)                        | 11 (5.0)         |                       | 11 (3.8)               | 1 (2.3)          |                       | 5.08 (±1.39)              |                       |
| (GG vs AA+AG)                           |                                |                  |                       |                        |                  |                       |                           | 0.014*                |
| <i>rs1800682 FAS -670 A&gt;G</i>        |                                |                  |                       |                        |                  |                       |                           |                       |
| AA                                      | 25 (25.0)                      | 69 (31.5)        |                       | 82 (28.6)              | 14 (35.0)        |                       | 5.44 (±1.33)              |                       |
| AG                                      | 46 (46.0)                      | 103 (47.0)       | 0.286                 | 132 (46.0)             | 21 (52.5)        | 0.195                 | 5.39 (±1.64)              | 0.228                 |
| GG                                      | 29 (29.0)                      | 47 (21.5)        |                       | 73 (25.4)              | 5 (12.5)         |                       | 5.06 (±1.29)              |                       |
| <i>rs763110 FASL -844 C&gt;T</i>        |                                |                  |                       |                        |                  |                       |                           |                       |
| CC                                      | 32 (32.0)                      | 79 (36.4)        |                       | 99 (34.9)              | 13 (31.7)        |                       | 5.38 (±1.32)              |                       |
| CT                                      | 51 (51.0)                      | 96 (44.2)        | 0.661                 | 133 (46.8)             | 19 (46.3)        | 0.836                 | 5.31 (±1.65)              | 0.930                 |
| TT                                      | 17 (17.0)                      | 42 (19.4)        |                       | 52 (18.3)              | 9 (22.0)         |                       | 5.31 (±1.34)              |                       |
| <i>rs5030772 FASL inv2nt_124 A&gt;G</i> |                                |                  |                       |                        |                  |                       |                           |                       |
| AA                                      | 77 (77.0)                      | 171 (79.2)       |                       | 217 (76.1)             | 34 (85.0)        |                       | 5.36 (±1.40)              |                       |
| AG                                      | 20 (20.0)                      | 41 (19.0)        | 0.330                 | 61 (21.4)              | 6 (15.0)         | 0.361                 | 5.19 (±1.33)              | 0.599                 |
| GG                                      | 3 (3.0)                        | 4 (1.9)          |                       | 7 (2.5)                | 0 (0.0)          |                       | 5.74 (±4.13)              |                       |
| <i>rs2279115 BCL-2 -938 C&gt;A</i>      |                                |                  |                       |                        |                  |                       |                           |                       |
| CC                                      | 32 (32.0)                      | 54 (25.0)        |                       | 81 (28.5)              | 8 (20.0)         |                       | 5.18 (±1.35)              |                       |
| CA                                      | 44 (44.0)                      | 108 (50.0)       | 0.353                 | 136 (47.9)             | 23 (57.5)        | 0.448                 | 5.32 (±1.46)              | 0.395                 |
| AA                                      | 24 (24.0)                      | 54 (25.0)        |                       | 67 (23.6)              | 9 (22.5)         |                       | 5.51 (±1.59)              |                       |
| <i>rs1042522 TP53 Pro72Arg (C&gt;G)</i> |                                |                  |                       |                        |                  |                       |                           |                       |
| CC (Pro/Pro)                            | 11 (10.9)                      | 21 (10.0)        |                       | 26 (9.3)               | 7 (17.9)         |                       | 5.98 (±1.98)              |                       |
| CG (Pro/Arg)                            | 42 (41.6)                      | 80 (37.9)        | 0.817                 | 110 (39.1)             | 13 (33.3)        | 0.238                 | 5.48 (±1.24)              | 0.004*                |
| GG (Arg/Arg)                            | 48 (47.5)                      | 110 (52.1)       |                       | 145 (51.6)             | 19 (48.7)        |                       | 5.06 (±1.48)              |                       |
| (CC + CG vs GG)                         |                                |                  |                       |                        |                  |                       |                           | 0.003*                |

DAS: disease activity score. <sup>a</sup>Pearson's chi square test; <sup>b</sup>ANOVA. \*p<0.05

**Table 5. Haplotypic and diplotypic frequencies estimated considering both Fas polymorphisms (*FAS* -1377 G>A and -670 A>G).**

|            | RA<br>n (%) | Controls<br>n (%) | <i>P</i> |
|------------|-------------|-------------------|----------|
| Haplotypes | n = 708     | n = 568           |          |
| G/A        | 365 (51.6)  | 261 (46.0)        | 0.060    |
| G/G        | 224 (31.6)  | 221 (38.9)        |          |
| A/A        | 11 (1.6)    | 7 (1.2)           |          |
| A/G        | 108 (15.2)  | 79 (13.9)         |          |
| Diploypes  | n = 354     | n = 284           |          |
| GG/GA      | 109 (30.8)  | 105 (37.0)        | 0.134    |
| GA/GA      | 98 (27.7)   | 55 (19.4)         |          |
| GA/AG      | 54 (15.3)   | 42 (14.8)         |          |
| GG/GG      | 40 (11.3)   | 43 (15.1)         |          |
| GG/AG      | 35 (9.9)    | 27 (9.5)          |          |
| Other      | 18 (5.1)    | 12 (4.2)          |          |

Pearson's chi square test was used to compare haplotypic and diplotypic frequencies between patients and controls; RA: rheumatoid arthritis

## **CAPÍTULO 6**

**Artigo original** “*Increased sFas, IL-6 and IL-10 levels in plasma and synovial fluid - who defines cell fate in rheumatoid arthritis?*”

Artigo submetido ao periódico *Autoimmunity*.



## CAPÍTULO 6: ARTIGO ORIGINAL 3

### **Increased sFas, IL-6 and IL-10 levels in plasma and synovial fluid – who defines cell fate in rheumatoid arthritis?**

Maria Cristina Cotta Matte<sup>a</sup>, Valéria de Lima Kaminski <sup>a</sup>, Tiago Degani Veit<sup>a</sup>, Márcia Polese-Bonato<sup>b</sup>, Andréa Cauduro de Castro<sup>c</sup>, Claiton Viegas Brenol<sup>d</sup>, Ricardo Machado Xavier<sup>d</sup>, Markus Bredemeier<sup>e</sup>, Luiz Roberto Stigler Marczyk<sup>f</sup>, João Luiz Ellera Gomes<sup>f</sup>, José Artur Bogo Chies<sup>a\*</sup>

#### **\*Corresponding author**

José Artur Bogo Chies

*Permanent Address*

Department of Genetics

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves, 9500

Caixa Postal 15053

91501-970 Porto Alegre, RS

Brazil

Email address: jabchies@terra.com.br

<sup>a</sup>Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Identificação Genética – Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Análises Clínicas, Hospital Nossa Senhora da Conceição, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup>Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>e</sup>Serviço de Reumatologia, Hospital Nossa Senhora da Conceição, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>f</sup>Serviço de Ortopedia e Traumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

**Word count:** 3451

## **Increased sFas, IL-6 and IL-10 levels in plasma and synovial fluid – who defines cell fate in rheumatoid arthritis?**

### **Abstract**

Rheumatoid arthritis (RA) is characterized by synovial hyperplasia and inflammatory cell infiltration in the joint. These features might be a consequence of impaired apoptosis allied to cellular proliferation, and it is possible that molecules such as Fas and FasL, which act as regulatory factors of these processes, would affect RA activity. In this study, we evaluated soluble Fas (sFas), soluble FasL (sFasL) and cytokine levels in plasma and in synovial fluid of RA, osteoarthritis (OA) and knee trauma patients. Soluble Fas and sFasL levels were measured by ELISA, and cytokines were measured using a Cytometric Bead Array kit. Significantly higher plasma sFas levels were observed in RA patients compared to OA patients ( $p=0.019$ ) and knee trauma patients ( $p=0.026$ ). In the RA group, negative correlations of sFas plasma levels with DAS28-ESR ( $r=-0.448$ ;  $p=0.037$ ) and ESR values ( $r=-0.600$ ,  $p=0.003$ ) were observed. No significant differences were detected in sFasL values between RA and OA patients. Increased levels of IL-6 and IL-10 in synovial fluid and plasma of RA were observed as compared to OA patients. A significant correlation between plasma IL-10 and plasma sFas levels was detected ( $r=0.707$ ,  $p=0.015$ ) in OA patients. No correlation between sFas, sFasL levels and cytokines was observed in RA patients. Our results show increased levels of sFas in RA and an association of sFas levels with lower disease activity, suggesting a possible role of sFas in pathogenesis of the disease.

**Keywords:** Rheumatoid arthritis, apoptosis, soluble Fas, soluble FasL, cytokines.

## Introduction

Apoptosis is an essential physiological mechanism, which helps the maintenance of immunological homeostasis. Any imbalance in the ability to eliminate self-reactive T or B cells could potentially lead to autoimmune disease development. Although several receptors and biochemical pathways regulate the apoptosis process, the Fas/FasL pathway has been the most extensively studied in autoimmunity, especially concerning Rheumatoid Arthritis (RA) [1].

Fas (CD95/APO-1) is a cell surface receptor, also known as a death receptor, that belongs to the TNF receptor family. Similarly, FasL (CD178) is a transmembrane protein that binds to the Fas receptor. The Fas-FasL interaction triggers the assembly of a protein complex (DISC, Death Initiation Signaling Complex) that leads to the activation of a downstream caspase cascade, resulting in cell apoptosis [2]. Both Fas and FasL occur either attached to the cell membrane (mFas and mFasL) and as soluble molecules (sFas and sFasL). Although apoptosis is the major consequence of Fas/FasL interaction, it has already been described that interactions of soluble forms of these molecules do not always drive this process. Actually, it was suggested that RA pathogenesis might be related to these molecules independently of apoptosis induction [3].

Rheumatoid arthritis is the most prevalent chronic autoimmune disorder that affects the synovial joints, leading to both cartilage and bone destruction. The disease is characterized by morphological changes, as synovial membrane hyperplasia, leukocyte infiltration, neoangiogenesis and chronic inflammation [4]. There is evidence that cellular accumulation, as well as pannus growth, observed in the RA synovia result from interaction between the cytokine milieu, cellular proliferation and low levels of local apoptosis. A complex network of cytokines and chemokines, including TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-6, regulates all these processes. In vitro studies showed that RA synovial fibroblasts express Fas, but not FasL, and are sensitive to FAS-mediated apoptosis [5–7]. However, apoptotic cells are very rarely detectable in the synovial cavity of RA, indicating a disruption in this process [8]. Previous studies described elevated levels of sFas and sFasL in the synovial fluid of RA patients, and these soluble molecules seem to act as antagonists of the apoptosis process by blocking the membrane Fas/FasL activation [9, 10]. Therefore, the aim of this study is to investigate sFas, sFasL and cytokine levels in plasma and synovial fluid from RA patients and to evaluate the potential association of

these molecules with disease severity. Samples from osteoarthritis patients and from knee trauma patients are used for comparison, establishing parameters of distinct inflammatory patterns.

## **Materials and Methods**

### ***Subjects***

For the present study, patients with RA, osteoarthritis (OA) and individuals with knee trauma submitted to surgery were recruited. Subjects with RA and OA were consecutively selected from the Division of Rheumatology at *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA, Porto Alegre, Brazil), and from the Division of Rheumatology at *Hospital Nossa Senhora da Conceição* (HNSC, Porto Alegre, Brazil), two major rheumatology centers in Rio Grande do Sul, the southernmost state of Brazil. Knee trauma patients were selected from the Department of Orthopedics and Traumatology at *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA, Porto Alegre, Brazil). The RA group comprised 28 patients diagnosed according to the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria [11]. Patients who concomitantly had any other autoimmune disease were excluded. Twenty-nine OA patients and 11 patients with knee trauma were selected as controls (Figure 1). This last group was composed by patients who have suffered physical trauma and needed surgical intervention. These individuals had no family history of autoimmune diseases, as declared in a standard questionnaire.

The collection of samples was carried out during 2008-2010, 2012-2013 and 2016-2017. Plastic citrate tubes were used for collecting peripheral blood and synovial fluid (SF) samples. SF samples were obtained from knee arthrocentesis and samples exhibiting blood contamination during collection procedure were excluded.

Disease activity in RA patients was determined using DAS28-ESR (Disease activity score including 28 joints – erythrocyte sedimentation rate). Assessment of clinical variables of DAS28 and collection of blood for C-reactive protein (CRP) and ESR measurements were performed in the same day or within a maximum of one week prior to plasma and SF sample collection. Further clinical and laboratory information, including rheumatoid factor (RF) positivity, and current treatment, were obtained from the medical records of the RA patients. All participants of this study signed a written

informed consent. The study protocol was approved by the Medical Ethics Committee of the involved institutions (CAAE 52996015.6.0000.5327).

### ***sFas and sFasL levels***

To assess sFas and sFasL levels in RA, OA and knee trauma patients, 5mL of peripheral blood was collected. Blood samples were centrifuged and plasma stored immediately at -20°C. Synovial fluid samples were centrifuged, treated with hyaluronidase (20 units/ml) for 30 minutes at 37°C, and stored at -20°C in a maximum of 2 hours after collecting. Samples stored for more than six months were transferred to a -80°C freezer. Fas and sFasL plasma and synovial fluid levels were measured by commercially available ELISA kits (ThermoFisher Scientific, Wilmington, USA), following manufacturer's instructions. Data were analyzed using a five parameter regression for the standard curves on the MyAssays.com website (<http://www.myassays.com/>).

### ***Th1/Th2/Th17 Cytokine Profile***

Cytokine analyses were performed using the Human Th1/Th2/Th17 Cytometric Bead Array kit (CBA; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), which allowed the simultaneous detection of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ , and IL-17A levels by flow cytometry. In order to ensure quality, only RA and OA synovial fluid and plasma samples stored at -80°C until use were included (Figure 1). Plasma and SF samples were treated as described previously and diluted 1:2 and 1:4, respectively. Due to potential direct implications in the cytokine levels, RA patients under biologic treatment were excluded from this analysis (n=5). CBA analysis was performed according to the manufacturer's instructions and final values were multiplied by the sample dilution factor. The analysis was performed on a FACS Array Bioanalyzer, using the FCAP FCS Filter and FCAP Array software (BD Biosciences, San Jose, CA). After debris removal, mean fluorescence intensities (MFIs) obtained for each sample were used to infer cytokine levels (pg/mL).

### ***Statistical Analyses***

Data were expressed as frequency, mean  $\pm$  standard deviation (SD) for variables following normal distribution or median and interquartile range (IQR) for variables not

following normal distribution. Circulating levels of sFas and sFasL were compared by a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. Cytokine levels were compared using a Mann-Whitney U test for independent samples. The Spearman rank correlation coefficient (r) was used to explore associations of sFas, sFasL and cytokine levels with disease activity variables (DAS28-ESR, ESR, CRP, RF). *P*-values <0.05 were considered as statistically significant. Statistical analyses were performed using the SPSS software for Windows Version 20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) and GraphPad Prism 5.01 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

## Results

### *sFas and sFasL levels in Rheumatoid Arthritis patients.*

Clinical, laboratory and socio-demographic data from RA, OA and knee trauma patients are shown in Table 1. No differences in sex composition were observed amongst the three groups. A significant difference in mean age was observed among the groups. CRP levels were significantly higher in RA as compared to OA patients. According to DAS28-ESR, 61% of the RA patients were classified as having a high disease activity (>5.1) whereas 39% were classified as having a moderate disease activity (3.2 to 5.1).

Significantly higher sFas plasma levels were observed in RA as compared to OA patients (adjusted *p*=0.019) and in RA as compared to knee trauma patients (adjusted *p*=0.026) (Table 2 and Figure 2). Considering sFas synovial fluid levels, no statistically significant differences were observed among groups, although RA patients showed numerically higher values compared to both OA and knee trauma patients (Table 2 and Figure 2).

When the associations of plasma and SF levels of sFas was tested, there were no significant correlations between them in all groups of patients (RA group, *r*=-0.164 *p*=0.559; OA group, *r*=-0.361 *p*=0.118; knee surgery group *r*=0.349; *p*=0.444).

sFas plasma levels significantly correlated with markers of RA disease activity. A negative correlation between sFas plasma levels and DAS28-ESR (*r*=-0.448; *p*=0.037), and ESR values (ESR *r*=-0.600, *p*=0.003) was observed. No correlation was found between sFas plasma levels and CRP, or RF titer. Moreover, no correlation of SF sFas levels with DAS28-ESR, ESR, CPR or RF was observed. Considering the OA patients, no significant correlation between sFas levels with CRP or ESR was observed.

Of note, sFasL levels were detectable in plasma or in synovial fluid of only a few patients, which hinder comparisons between groups. A value equal to zero was attributed to those samples with values below the detection limit of the test. sFasL was detected in 13 (46%) plasma and 8 (44%) synovial fluid samples of RA patients, and 9 (31%) plasma and 6 (27%) synovial fluid samples of OA patients and 3 (27%) plasma samples from knee trauma patients. All synovial samples from knee trauma patients displayed values below the detection limit of the test. No significant differences were detected comparing the sFasL levels of RA, OA patients and knee trauma patients (Table 2). Also, no significant correlation between sFasL levels and RA disease severity (DAS28-ESR) or ESR and CRP levels in RA and OA groups was observed.

### ***Plasma and synovial fluid cytokine levels***

Cytokine plasma and SF levels measured in RA and OA patients are depicted in Table 3. Significant differences between RA and OA patients were observed for IL-6, IL-10 and TNF levels, always in the direction of higher levels observed in the biological material from RA patients (Table 3). Of note, the highest value for IL-6 levels was observed in the synovial fluid of RA patients. IL-6 levels were significantly higher in RA as compared to OA patients in both plasma and SF ( $p=0.030$  and  $p=0.039$ , respectively). Additionally, higher IL-10 plasma and SF levels were observed in RA as compared to OA patients ( $p=0.008$  and  $p=0.025$ , respectively). Finally, RA patients had higher TNF levels in both plasma and SF as compared to OA patients, although the results only reached a significant statistical difference concerning the plasma levels ( $p=0.026$ ).

When the clinical profile of the RA patients was analyzed, no correlation between plasma cytokine levels with DAS28-ESR was observed (including IL-6;  $r=0.198$ ,  $p=0.447$ ). On the other hand, SF IL-6 levels positively correlated to DAS28-ESR ( $r=0.752$ ,  $p=0.008$ ), ESR ( $r=0.586$ ,  $p=0.058$ ) and CRP ( $r=0.060$ ,  $p=0.861$ ) values. No correlation between plasma cytokine levels with ESR or CRP values was observed for RA and OA patients. Considering the OA patients, SF IL-6 levels positively correlated to CRP ( $r=0.943$ ,  $p=0.005$ ). No correlation was detected considering plasma or SF sFasL levels and cytokine levels in RA patients. In contrast, a significant correlation between plasma IL-10 and sFasL levels was observed ( $r=0.707$ ,  $p=0.015$ ) in OA patients.

## Discussion

Synovial hyperplasia and inflammatory cell infiltration in the joints are typical features in the clinical course of rheumatoid arthritis. The presence of an inflammatory milieu in RA is characterized by proinflammatory cytokines, activation of immune cells, proliferation of synovial fibroblasts, and tissue remodeling. The presence of a hyperplastic tissue in the synovial cavity may possibly be a consequence of impaired apoptosis and/or exacerbated cellular proliferation. In both scenarios, the involvement of molecules such as Fas and FasL as regulatory factors has been suggested [3, 12]. In this context, the present study evaluated sFas and sFasL levels in plasma and SF of RA, osteoarthritis and knee trauma patients. Of note, OA and knee trauma patients were evaluated as “controls” to allow the establishment of parallels with distinct inflammatory patterns, since obtaining synovial fluid from normal/healthy individuals would be ethically unacceptable. Additionally, plasma and synovial fluid levels of several cytokines were evaluated in RA and OA patients and correlated to sFas and sFasL levels and clinical features.

Our results suggest an important role of sFas in the RA pathogenesis. sFas levels were higher in RA compared to OA patients and knee trauma patients, both in plasma as well as in synovial fluid, although in SF the differences were not statistically significant. Nevertheless, conflicting results considering sFas levels in RA can be found in the literature. Some studies also reported elevated levels of sFas in serum [10, 13] or SF [9] from RA patients, whereas other authors described no differences in sFas levels between RA patients and controls [14–18].

It has also been suggested that the presence of the sFas is an exacerbating factor of RA, once its levels have been positively correlated with serum CRP, ESR, RF titers and disease activity [14, 19]. Contrary to these findings, our results point to a significant and negative correlation between plasma sFas levels and DAS28-ESR and ESR values in RA patients. In the SF, no significant correlation of sFas with disease activity was observed, which could be explained by the fact that all joints aspirated in this study similarly presented high levels of local inflammation. High RA activity has been associated to lower apoptotic levels in synovia, higher levels of sFas in SF and lower levels in serum [15, 20]. The accumulation of sFas in inflamed RA joints, may be involved



in the inhibition of apoptosis of synovial cells or synovial infiltrating cells, leading to the persistence of inflammation and synovial hyperplasia [19].

Interestingly few samples showed detectable sFasL levels in plasma or SF although previous studies have demonstrated increased sFasL levels in the plasma and SF from RA patients compared to OA controls [16, 22, 23, 24]. sFasL production is mediated by cleavage of the membrane form by metalloproteinases, which are enriched in the inflamed synovial cavity of RA patients [21], which might explain the elevated SF sFasL levels observed in the literature. Also, higher levels of sFasL in SF were observed in RA patients with severe disease [23]; however, in the present study, sFasL levels did not correlated with disease activity.

The low levels of sFasL detectable in our sample seems to be a result of the inflammatory pattern of each group, since the proportion of individuals with detectable sFasL in plasma and SF was higher among RA patients when compared to OA and knee trauma patients. The attribution of zero as a numerically value for all levels below the detection limit of the test may underestimate sFasL levels in our sample. However, since less than a half of all tested individuals showed detectable sFasL levels, we chose not to disregard these samples in the analysis.

Actually, the role of sFas/sFasL in the RA pathogenesis is still under debate. Fibroblast-like synoviocytes (FLS) are a major cell type involved in synovia hyperplasia. Despite evidences that these cells are susceptible to Fas-mediated apoptosis in vitro, apoptotic cells are very rarely detectable in the synovia of RA [8, 24]. High expression of anti-apoptotic proteins as Bcl-2 and Flip in the synovia might explain these findings [25]. Additionally, the soluble isoforms of Fas and FasL have been implicated in apoptosis inhibition. It has been suggested that sFas modifies ligand concentration, downregulates membrane receptor numbers, and specifically inhibits ligand–receptor association in the extracellular space, thus preventing induction of apoptosis [26]. Similarly, previous studies demonstrated that sFasL does not form oligomers with Fas receptor, therefore not triggering apoptosis, in contrast to its respective membrane-bound form [21]. Indeed, the binding of sFasL to Fas receptor has been associated to FLS proliferation through Akt signaling pathway [27], contributing, in turn, to disease pathogenesis and inflammation.

It is noteworthy that the inflammatory milieu observed in RA plays a pivotal role in immune activation, cellular proliferation and apoptosis. In this sense, we also investigated cytokine levels in SF and plasma samples from RA and OA patients. A significant increased level of IL-6 was observed in plasma and SF from RA patients compared to OA patients. In RA patients, IL-6 SF levels also positively correlated to DAS28-ESR and ESR values, which is in agreement to previous findings [28]. This cytokine is considered a key mediator in the RA inflammatory process, and significantly higher IL-6 levels have been seen in the synovial fluid of RA patients [29]. Importantly, IL-6 is related to immunoglobulin secretion by activated B cells, also acting as a regulator of CD4<sup>+</sup> T cell differentiation and activation [30].

In the present study, high IL-10 levels were observed in RA patients, both in plasma and in SF, which is in agreement with previous data [31]. TNF levels were also higher in plasma from RA patients compared to OA patients. Interestingly, IL-10 is a cytokine known for its immunosuppressive properties. However, in chronic inflammatory conditions as RA, increased levels of IL-10 could represent a compensatory mechanism of the immune system in an attempt to reach homeostasis. Besides, in RA synovial tissue cultures, IL-10 production occurs concomitantly with the synthesis of proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-6, suggesting the existence of a tightly controlled signaling network involved in the regulation of synovial inflammation. Moreover, IL-10 induces B cell proliferation and differentiation to antibody producing cells, and might upregulates the production of RF in RA [32, 33].

When approaching potential correlations of sFas and cytokine levels, we observed a positive correlation between sFas and IL-10 plasma levels in OA, but not in RA patients. In a previous study in RA, IL-6 and sFas levels were positively correlated in the synovial fluid, whereas negatively correlated in serum [9]. In addition, increased sFas expression was observed in RA FLS culture supernatant after TNF- $\alpha$  stimulation [24]. Despite the higher levels of IL-6 and TNF detected in RA patients, no correlation between these cytokines and sFas or sFasL levels was observed in our study. This result suggests that the role of these molecules is not dependent of an autoimmune process. The lack of correlation with any of the crucial proinflammatory cytokines that drives RA possibly underlies the fact that these molecules, in the synovium, exert independent functions [22].

In summary, the present study investigated the role of sFas, sFasL and cytokines in RA pathogenesis. Our results confirm previous findings concerning sFas levels in plasma and synovial fluid from RA individuals. The presence of this molecule can, at least partially, explain the apoptosis impairment observed in RA. Moreover, the high IL-6 and IL-10 levels in both plasma and synovial fluid from RA patients, observed in our study, do reinforce a potential role of these cytokines in the disease pathogenesis. Taking into consideration that no strong correlations between sFas, sFasL and cytokine levels were observed, we suggest that these factors exert independent but complementary roles in the disease pathogenesis. In conclusion, the cell fate in RA will be driven by the interaction of an inflammatory milieu and distinct soluble factors, among which sFas potentially stands out.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank clinical support given by the medical professionals from the Rheumatology Division of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* and from the Rheumatology Division of the *Hospital Nossa Senhora da Conceição*. In addition, we would like to thank the technical support given by the professionals from the clinical laboratory of the *Hospital Nossa Senhora da Conceição* and *Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (Uamp)* of *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*.

## **Conflict of interest**

The authors declare no conflicts of interest.

## **Funding Information**

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: this work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## References

1. Peng SL. Fas (CD95)-related apoptosis and rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2006;45:26–30.
2. Favaloro B, Allocati N, Graziano V, et al. Role of Apoptosis in disease. *Aging*. 2012;4:330–349.
3. Calmon-Hamaty F, Audo R, Combe B, et al. Targeting the Fas/FasL system in Rheumatoid Arthritis therapy: Promising or risky? *Cytokine*. 2015;75:228–233.
4. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;388:2023–2038.
5. Liu H, Pope RM. The role of apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3:317–322.
6. Pope RM. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:527–35.
7. Firestein GS, McInnes IB. Review Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*. 2017;46:183–196.
8. Li X, Zhang Z, Peng A, et al. Effect of CD95 on inflammatory response in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Cell Immunol*. 2014;290:209–216.
9. Hasunuma T, Kayagaki N, Asahara H, et al. Accumulation of soluble Fas in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 1997;40(1):80-86.
10. Sahin M, Aydintug O, Tunc SE, et al. Serum soluble Fas levels in patients with autoimmune rheumatic diseases. *Clin Biochem*. 2007;40:6–10.
11. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010;62:2569–2581.
12. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 2003;423:356–

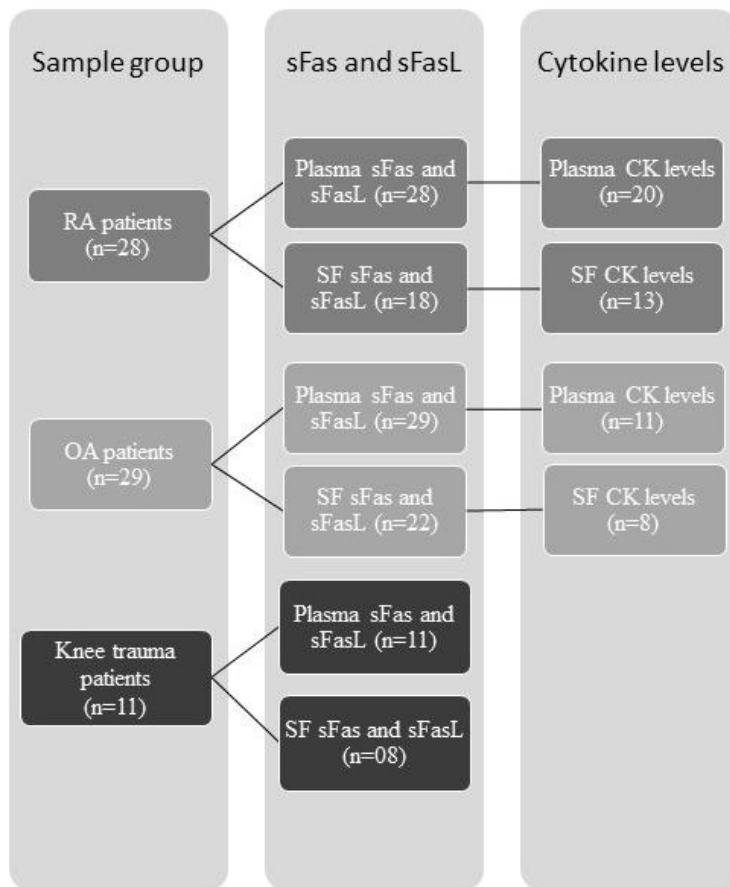
- 61.
13. Christensson M, Pettersson E, Eneslätt K, et al. Serum sFAS levels are elevated in ANCA-positive vasculitis compared with other autoimmune diseases. *J Clin Immunol.* 2002;22:220–7
  14. Ateş A, Kinikli G, Turgay M, Duman M. The levels of serum-soluble Fas in patients with rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* 2004;23:421–425.
  15. Romano E, Terenzi R, Manetti M, et al. Disease Activity Improvement in Rheumatoid Arthritis Treated with Tumor Necrosis Factor- Inhibitors Correlates with Increased Soluble Fas Levels. *J Rheumatol.* 2014;41:1961–1965.
  16. Mrabet D, Hajri R, Hamzaoui K, et al. Soluble Fas and soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a Tunisian case-control study. *Clin Exp Rheumatol.* 2007; 25:797–8
  17. Goel N, Ulrich DT, St Clair EW, et al. Lack of correlation between serum soluble Fas/APO-1 levels and autoimmune disease. *Arthritis Rheum.* 1995;38:1738–1743.
  18. Nozawa K, Kayagaki N, Okumura KO, Hasimoto H. Soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in Rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 1997;40(6):1126–1129.
  19. Hasunuma T, Kayagaki N, Asahara H, et al. Accumulation of soluble Fas in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997; 40:80–86.
  20. Dubikov A, Kalinichenko S. Small molecules regulating apoptosis in the synovium in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2010;39:368–372.
  21. Schneider P, Holler N, Bodmer J-L, et al. Conversion of Membrane-bound Fas(CD95) Ligand to Its Soluble Form Is Associated with Downregulation of Its Proapoptotic Activity and Loss of Liver Toxicity. *J Exp Med.* 1998;187:1205–1213.

22. Audo R, Calmon-Hamaty F, Papon L, et al. Distinct effects of soluble and membrane bound Fas ligand on fibroblast-like synoviocytes from Rheumatoid Arthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2014;66(12):3289-3299.
23. Hashimoto H, Tanaka M, Suda T, et al. Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1998;41:657–662.
24. Hong S, Kim EJ, Lee EJ, et al. TNF- $\alpha$  confers resistance to Fas-mediated apoptosis in rheumatoid arthritis through the induction of soluble Fas. *Life Sci.* 2015;122:37–41.
25. Catrina AI, Ulfgren AK, Lindblad S, et al. Low levels of apoptosis and high FLIP expression in early rheumatoid arthritis synovium. *Ann Rheum Dis.* 2002;61:934–6.
26. Cheng J, Zhou T, Liu C, et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science.* 1994;(80-) 263:1759–1762.
27. Audo R, Calmon-Hamaty F, Papon L, et al. Distinct effects of soluble and membrane-bound Fas ligand on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66:3289–3299.
28. Shrivastavaa AK, Singhb HV, Raizadac A. Inflammatory markers in patients with rheumatoid arthritis. *Allergol Immunopathol.* 2015;43(1):81-87.
29. Matsumoto T, Tsurumoto T, Shindo H, et al. Interleukin-6 levels in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis correlated with the infiltration of inflammatory cells in synovial membrane. *Rheumatol Int.* 2006;26:1096–100.
30. Yoshida Y, Tanaka T. Interleukin 6 and Rheumatoid Arthritis. *BioMed Research International.* 2014;2014:698313.
31. Alanära T, Karstila K, Moilanen T, et al. Expression of IL-10 family cytokines in rheumatoid arthritis: elevated levels of IL-19 in the joints. *Scandinavian Journal of Rheumatology.* 2010;39(2):118-126.
32. St Clair EW. Interleukin 10 treatment for rheumatoid arthritis. *Annals of the*

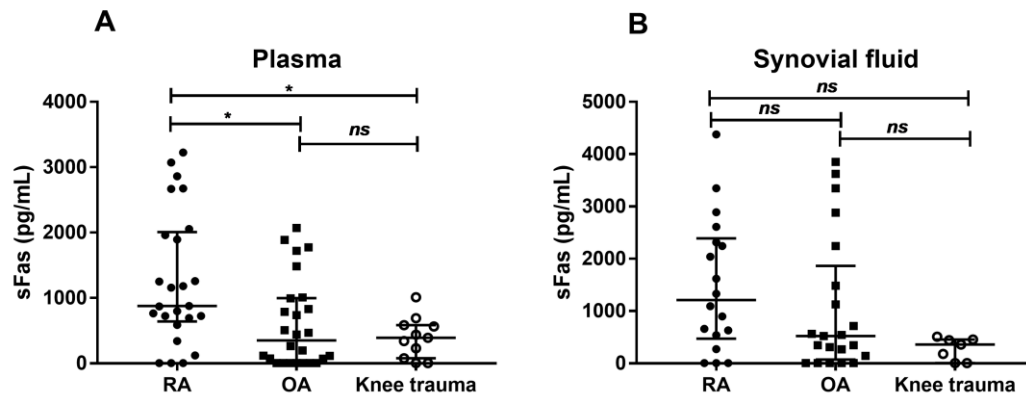
Rheumatic Diseases. 1999;58:(Suppl I) I99–I102.

33. Cush JJ, Splawski JB, Thomas R, et al. Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 1995;38(1):96-104.





**Figure 1.** Stratification of RA, OA and knee trauma samples according to the type of the samples available and its storage conditions. For all groups, sFas/sFasL assays were performed in samples stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  or  $-80^{\circ}\text{C}$ , whereas only samples stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  were used for cytokine analyses. RA: Rheumatoid Arthritis; OA: Osteoarthritis; CK: Cytokine; SF: Synovial fluid.



**Figure 2.** (A) sFas levels in the plasma measured from RA, OA and knee trauma patients. Significant differences in sFas levels are observed between RA and knee trauma, and RA and OA patients. (B) sFas levels in the synovial fluid measured from patients with RA, OA and knee trauma. Data are presented as median (IQR). Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test. \* $p < 0.05$ , ns: not significant.

**Table 1.** Clinical, laboratorial and socio-demographic features of RA, OA and knee trauma patients.

|                                  | <b>RA group<br/>(n=28)</b> | <b>OA group<br/>(n=29)</b> | <b>Knee trauma group<br/>(n=11)</b> | <b>p-value</b>           |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| Female sex, n (%)                | 20 (74.1)                  | 19 (82.6)                  | 5 (45.5)                            | 0.074 <sup>a</sup>       |
| Age, mean ( $\pm$ SD)            | 58.1 ( $\pm$ 10.0)         | 66.2 ( $\pm$ 11.4)         | 39.3 ( $\pm$ 11.8)                  | <b>0.015<sup>b</sup></b> |
| CRP levels, mean ( $\pm$ SD)     | 11.7 ( $\pm$ 11.0)         | 5.9 ( $\pm$ 3.8)           | -                                   | <b>0.020<sup>c</sup></b> |
| ESR levels, mean ( $\pm$ SD)     | 23.6 ( $\pm$ 14.1)         | 21.2 ( $\pm$ 14.4)         | -                                   | 0.532 <sup>c</sup>       |
| DAS28-ESR, mean ( $\pm$ SD)      | 4.5 ( $\pm$ 1.2)           | -                          | -                                   | -                        |
| Rheumator factor positive, n (%) | 20 (71.4)                  | -                          | -                                   | -                        |
| Current treatment, n (%)         |                            |                            |                                     |                          |
| <i>DMARD</i>                     | 28 (100)                   | -                          | -                                   | -                        |
| <i>Biological treatment*</i>     | 5 (17.9)                   | -                          | -                                   | -                        |

<sup>a</sup>Pearson's chi-square; <sup>b</sup>one-way ANOVA; <sup>c</sup> Student's *t* test. CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; *DMARD*: disease-modifying anti-rheumatic drugs. \*Anti-TNF therapy (n=3); Anti-IL-6 therapy (n=1); JAK inhibitor (n=1).

**Table 2.** sFAS and sFasL levels in RA, OA and Knee trauma groups.

|                       | <b>RA group<br/>(n=28)</b> | <b>OA group<br/>(n=29)</b> | <b>Knee trauma group<br/>(n=11)</b> | <b>p-value*</b>                                      |
|-----------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|--|
| <b>sFas levels</b>    |                            |                            |                                     |  |
| <i>Plasma</i>         | 878.5 (640.2 - 2008.5)     | 442.5 (6.6 – 1007.0)       | 390.4 (77.1 – 586.2)                | <b>0.019<sup>a</sup></b><br><b>0.026<sup>b</sup></b> |
| <i>Synovial Fluid</i> | 1212.0 (472.3 - 2390.0)    | 552.9 (74.7 – 1865.0)      | 361.2 (6.6 – 454.4)                 | 0.056  |
| <b>sFasL levels†</b>  |                            |                            |                                     |  |
| <i>Plasma</i>         | 0.00 (0.00 - 0.07)         | 0.00 (0.00 – 0.02)         | 0.00 (0.00 - 0.10)                  | <i>ns</i>  |
| <i>Synovial Fluid</i> | 0.00 (0.00 - 0.04)         | 0.00 (0.00 - 0.00)         | 0.00 (0.00 - 0.00)                  | <i>ns</i>  |

sFas and sFasL levels are represented as median (IQR), (Fas: pg/mL; FasL ng/mL). \* Samples were compared using Kruskal-Wallis test with Dunn’s multiple comparison test. *ns*: not significant. † Zero was imputed to levels of sFasL below the limit of detection.

<sup>a</sup> RA vs. OA

<sup>b</sup> RA vs. knee trauma

**Table 3.** Cytokine levels in RA and OA patients.

| Cytokine      | RA<br>(plasma)<br>(n=20) | RA<br>(synovial fluid)<br>(n=13) | OA<br>(plasma)<br>(n=11) | OA<br>(synovial fluid)<br>(n=8) | p-value  |
|---------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--|
| IL-2          | 2.39 (2.11-3.65)         | 2.16 (2.08-2.33)                 | 2.21 (2.01-2.36)         | 2.13 (2.04-2.30)                | 0.158 <sup>a</sup><br>0.678 <sup>b</sup>             |
| IL-4          | 1.89 (1.72-2.62)         | 1.80 (1.66-2.23)                 | 1.72 (1.63-1.89)         | 1.70 (1.65-2.00)                | 0.103 <sup>a</sup><br>0.624 <sup>b</sup>             |
| IL-6          | 3.04 (2.24-5.93)         | 367.69 (30.34-1537.88)           | 1.99 (1.74-2.26)         | 44.0 (8.93-144.19)              | <b>0.030<sup>a</sup></b><br><b>0.039<sup>b</sup></b> |
| IL-10         | 1.15 (1.01-1.55)         | 1.18 (1.07-2.54)                 | 0.95 (0.93-1.01)         | 1.01 (0.93-1.24)                | <b>0.008<sup>a</sup></b><br><b>0.025<sup>b</sup></b> |
| IL-17         | 2.58 (2.33-3.72)         | 3.86 (2.87-5.35)                 | 2.85 (2.69-3.09)         | 3.14 (2.46-9.11)                | 0.171<br>0.678                                       |
| TNF           | 2.03 (1.56-2.62)         | 1.85 (1.63-2.32)                 | 1.58 (1.46-1.68)         | 1.77 (1.47-2.50)                | <b>0.026<sup>a</sup></b><br>0.624 <sup>b</sup>       |
| IFN- $\gamma$ | 1.36 (1.25-1.62)         | 1.50 (1.34-2.37)                 | 1.29 (1.26-1.78)         | 1.46 (1.21-1.88)                | 1.000 <sup>a</sup><br>0.624 <sup>b</sup>             |

Cytokine levels are represented as median (IQR, interquartile range), (pg/mL). Significant *p*-values are shown in bold.

<sup>a</sup>RA plasma cytokine level vs. OA plasma cytokine level

<sup>b</sup>RA SF cytokine level vs. OA SF cytokine level

## **CAPÍTULO 7**

### **DISCUSSÃO**

## CAPÍTULO 7: DISCUSSÃO

A AR é uma doença autoimune que afeta aproximadamente 1% da população Brasileira (MARQUES-NETO *et al.*, 1993). Seu caráter crônico e inflamatório ocasiona o desenvolvimento de deformidades incluindo erosão óssea que se tornam extremamente debilitantes para o paciente, impossibilitando-o de exercer suas atividades cotidianas, domésticas e de lazer. Além disso, a inflamação persistente pode comprometer outros órgãos do corpo humano, o que contribui para as altas taxas de mortalidade e morbidade associadas à doença (FIRESTEIN; MCINNES, 2017). O impacto social e econômico dessa doença é evidente visto que 60% dos indivíduos portadores de AR são afastados de suas atividades de trabalho após 15 anos da doença (DA MOTA; LAURINDO; NETO, 2010a).

Apesar de ser uma doença extensivamente estudada, a patogênese da AR ainda não foi completamente elucidada. Uma das hipóteses descritas na literatura refere-se a uma desregulação do processo de apoptose, a qual ocasiona o acúmulo de células em tecidos sinoviais bem como a proliferação de células que contribuem para a exacerbação do processo inflamatório. A apoptose é um evento celular regulado por uma intrincada rede de moléculas (como Fas/FasL, moléculas da família Bcl-2, p53 e caspases), sendo um processo importante na manutenção da homeostase do organismo com a eliminação de células auto reativas. Acredita-se que uma perturbação dos eventos de apoptose também ocorra em células do sistema imune que infiltram a articulação como linfócitos T-CD4+, T-CD8+ e células NK, uma vez que o acúmulo dessas células já foi descrito em líquido sinovial de pacientes com AR (LIU; POPE, 2003; POPE, 2002).

Dentre as células que infiltram a articulação sinovial de pacientes com AR, destaca-se a participação das células NK. A célula NK é um importante componente do sistema imune inato, pois apresenta um notório potencial citotóxico nos tecidos periféricos (especialmente considerando-se as células NK CD56<sup>dim</sup>). No entanto, nas articulações sinoviais de pacientes com AR, observa-se um acúmulo de células NK fenotipicamente caracterizadas como CD56<sup>bright</sup>. Essas células expressam receptores NKG2 e apresentam um importante papel imunorregulador, através da produção das citocinas TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ . Além disso, um estudo realizado por Gunturi *et al.*, demonstrou

menores taxas de apoptose associadas às células NK CD94/NKG2<sup>+</sup> (GUNTURI; BERG; FORMAN, 2003).

Considerando as informações disponíveis na literatura, esta tese foi elaborada sobre três pilares: as células NK, os fatores de apoptose e a inflamação, os quais se interrelacionam (Figura 9). Os objetivos da presente tese foram estruturados a partir da hipótese que as células NK presentes na articulação de pacientes com AR apresentam o perfil CD56<sup>bright</sup>, expressam receptores NKG2, apresentam menores taxas de apoptose (influenciada pelo recrutamento de fatores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos como Fas/FasL, Bcl-2 e p53) e contribuem para a exacerbação do processo inflamatório da AR.

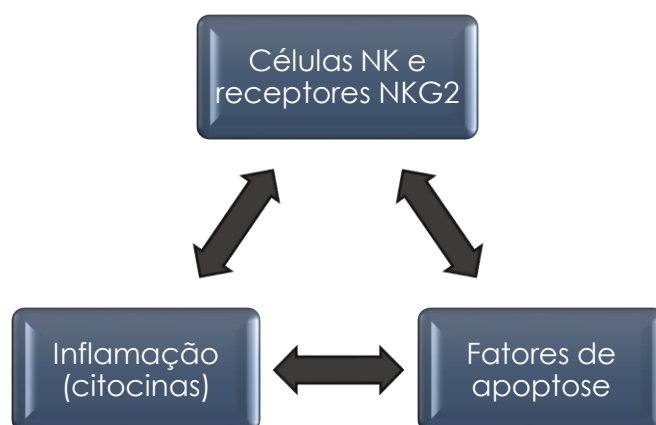


Figura 9: Representação esquemática da interação entre células NK, receptores NKG2, fatores de apoptose e inflamação. A interação entre esses fatores decorreria do fato de células NK presentes na articulação de pacientes com AR apresentarem o perfil CD56<sup>bright</sup> NKG2<sup>+</sup>. Essas células seriam menos susceptíveis à morte celular programada, permanecendo mais tempo no sítio inflamatório, contribuindo desta forma, para a exacerbação da inflamação através da produção das citocinas TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ . Fonte: Elaborada pelo autor.

Este trabalho partiu de uma abordagem imunogenética com foco na avaliação do papel de quatro polimorfismos em genes de receptores de células NK (*NKG2*) e seis variantes em genes que codificam proteínas envolvidas nas vias apoptose na susceptibilidade à AR e gravidade da doença. As variantes genéticas foram escolhidas com base na sua funcionalidade bem como a partir de estudos prévios que descreveram associação desses fatores e o desenvolvimento de doenças autoimunes. Cabe ressaltar que não foram identificados trabalhos envolvendo o estudo de tais variantes na população brasileira e sua relação com a AR. Com o objetivo de complementar as análises moleculares, realizou-se uma análise da expressão de fatores solúveis Fas e FasL e



citocinas em pacientes com AR, osteoartrite (OA) e indivíduos com trauma de joelho. As análises dessas moléculas em pacientes com diferentes perfis de inflamação complementam o entendimento da participação desses fatores na patofisiologia da AR.

A primeira etapa do presente trabalho gerou, dois artigos científicos, os quais foram apresentados nos capítulos anteriores. A investigação dos polimorfismos nos genes *NKG2* não evidenciou qualquer relação das variantes *NKG2A* (c. 338-90G>A rs2734440), deleção de *NKG2C* e *NKG2D* (Ala72Thr G>A; rs1049174 e \*348 G>C rs2255336) com a susceptibilidade ou a severidade à AR. Os resultados encontrados nesse estudo estão de acordo com dados prévios da literatura (HIKAMI et al., 2003; IWASZKO et al., 2016; MARIASELVAM et al., 2016; MIYASHITA et al., 2004). No entanto, resultados discordantes já foram descritos. A presença do genótipo AA em *NKG2D* rs225533 já foi associada a um maior risco no desenvolvimento de AR e efeito protetor no desenvolvimento de LES (KABALAK et al., 2010; PARK; PARK; SONG, 2008; PIOTROWSKI et al., 2012). Além disso, polimorfismos em *NKG2A* e *NKG2D* foram associados, respectivamente, a diferenças na resposta ao tratamento com anti-TNF e à severidade da AR (IWASZKO et al., 2016; MARIASELVAM et al., 2016). Atribuímos as diferenças encontradas à composição étnica e, conseqüentemente genética, das populações estudadas, pois a maioria dos estudos com dados disponíveis na literatura foram conduzidos em populações asiáticas.

Considerando a escassez de estudos na literatura a respeito de polimorfismos em *NKG2*, acrescentamos ao estudo uma revisão bibliográfica sobre o tópico. A partir desta revisão identificou-se um importante papel dessas variantes em outras condições patológicas ou de interesse para a clínica médica, além das situações de autoimunidade, como infecções virais, câncer, gestação e transplantes. A dinâmica da atividade das células NK depende da expressão de um conjunto de receptores em sua superfície celular, os quais regulam as sinalizações ativadoras e inibitórias desencadeadas pela interação dessas moléculas com seus respectivos ligantes (PEGRAM et al., 2011). Além disso, as moléculas *NKG2* parecem apresentar um importante papel de regulação da inflamação, pois estão diretamente envolvidas na indução da síntese de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  pelas células NK (DE MATOS et al., 2007). Ainda, linfócitos T-CD4<sup>+</sup> e T-CD8<sup>+</sup> *NKG2*<sup>+</sup> já foram avaliados em pacientes com AR, sugerindo um papel

de coestimulação dos receptores NKG2 na ativação de linfócitos T em condições inflamatórias (GROH et al., 2003; WALSH et al., 2011).

Nesse contexto, apesar da falta de associação entre os polimorfismos de *NKG2* e a susceptibilidade à AR em nosso estudo, sustentamos que o papel dessas moléculas em situações de inflamação, como a AR, não pode ser ignorado. Além disso, o papel de polimorfismos em genes *NKG2* ainda é pouco explorado, sendo o conhecimento dos efeitos dessas variantes na expressão dos seus respectivos receptores e sua capacidade de interação com seus ligantes, ainda incipientes.

Com relação ao papel 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 Pro72Arg (G12139C) do gene *TP53* na suscetibilidade à AR e severidade da doença, identificamos *FAS* -670AA e *BCL-2* -938CC como potenciais marcadores de susceptibilidade à doença, e *FAS* -1377GG e *TP53* Pro/Pro como variantes importantes na modulação da severidade da AR.

Fas e FasL, atuando em conjunto como receptor/ligante, compõe um dos principais receptores ativadores da via extrínseca de apoptose. A interação entre FasL de membrana com o receptor de membrana Fas provoca o recrutamento do complexo DISC, que culmina na ativação da via das caspases e apoptose da célula. De forma oposta, a presença das isoformas solúveis de Fas e FasL (sFas e sFasL, respectivamente) inibe esse evento, pois as formas solúveis competem pelo mesmo sítio de interação que suas respectivas formas de membrana, no entanto essa interação não é capaz de induzir o processo de apoptose. No entanto, a interação entre sFasL e o receptor Fas de membrana já foi associada à proliferação de fibroblastos sinoviais (HONG et al., 2015; KOBAK; BERDELI, 2012; TREVIÑO-TALAVERA et al., 2014).

O papel dos genes de *BCL-2* e *TP53* ainda é pouco explorado no contexto da autoimunidade, sendo a maioria dos estudos relativos ao desenvolvimento do câncer (MATAKIDOU; EISEN; HOULSTON, 2003; ZHANG et al., 2014). Os resultados do nosso estudo apontam para existência de um efeito de variantes em *BCL-2* e *TP53* na susceptibilidade à AR e severidade da doença, respectivamente. Devido ao papel anti-apoptótico da molécula BCL-2, uma das hipóteses a ela relacionada era que a variante responsável por uma maior produção da molécula estaria associada à presença de AR,

uma vez que elevados níveis de BCL-2 contribuiriam para as baixas taxas de apoptose *in vivo* observadas na doença. Contudo, nossos resultados contrariam esta visão: o genótipo CC de *BCL-2* foi associado a um maior risco no desenvolvimento de AR quando comparado ao alelo A, sendo a variante C, associada a uma menor expressão de BCL-2 (MEKA *et al.*, 2016). No entanto, quando da análise da expressão dessa molécula em pacientes com AR, alguns estudos não observam diferenças nos seus níveis em comparação a indivíduos com osteoartrite (ISOMÄKI *et al.*, 1996). Assim, cabe ainda investigar se a similaridade nos níveis pode ser atribuída a fatores genéticos.

Em relação ao gene *TP53*, nenhum dos estudos identificou papel da variante Pro72Arg na susceptibilidade a AR (ASSMANN *et al.*, 2009; MOODLEY; MODY; CHUTURGOON, 2010), o que está de acordo com os nossos resultados. Por outro lado, encontramos uma relação da variante CC (Pro/Pro) com níveis mais elevados de DAS28. Sendo DAS28 um escore de avaliação de atividade de doença em pacientes com AR, este foi utilizado como um dos parâmetros para inferência de severidade da doença a partir de uma análise transversal. Salienta-se, no entanto, que este índice pode apresentar influência do tratamento, percepção do paciente sobre a doença, e níveis de marcadores inespecíficos de inflamação. Encontramos um único estudo, conduzido na população italiana, que descreve uma associação do mesmo genótipo (Pro/Pro) com o desenvolvimento de erosões ósseas em pacientes com AR (MACCHIONI *et al.*, 2007).

De uma forma geral, nosso trabalho corrobora alguns dados previamente descritos na literatura para outras populações além de descrever, pela primeira vez, a associação de certas variantes genéticas com AR e a severidade da doença. Uma vez que optamos por não utilizar métodos estatísticos para comparações múltiplas - pois estes podem influenciar na detecção de polimorfismos que apresentam uma pequena contribuição a um desfecho multifatorial como a AR - sugerimos que nossos achados sejam avaliados e corroborados em outras populações.

A segunda etapa do presente trabalho teve como objetivo o estudo do papel de fatores solúveis (sFas, sFasL e citocinas) na patofisiologia da AR. Nesse estudo, destacaram-se os fatores sFas, IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  como moléculas importantes na patogênese da AR. Foram observados níveis elevados de sFas em plasma e líquido sinovial em pacientes com AR quando comparados a pacientes com OA e pacientes com

trauma de joelho, apesar da diferença ter se mostrado estatisticamente significativa somente em amostras de plasma. Ainda, foi observada uma correlação negativa dos valores de sFas de plasma com o escore de DAS28 e níveis de velocidade de hemossedimentação. Com relação aos valores de sFasL, não observamos diferenças significativas entre os grupos, seja para plasma ou para líquido sinovial. Contudo, é importante ressaltar que uma parcela significativa dos indivíduos analisados tanto no grupo de AR quanto nos grupos controles, não apresentou níveis detectáveis dessa molécula, seja no plasma ou no líquido sinovial, o que difere de resultados previamente descritos na literatura (MRABET *et al.*, 2015; HASHIMOTO *et al.*, 1998). Uma das limitações do nosso estudo está relacionada a uma possível subestimativa nos valores de sFasL na nossa amostra, uma vez que o valor zero foi atribuído para as amostras que apresentaram valores abaixo do limite de detecção do teste. Por outro lado, analisar somente os valores detectáveis representaria um viés de seleção, pois mais da metade dos indivíduos analisados apresentou valores indetectáveis. Especula-se que diferentes fatores como o tratamento dos indivíduos, a presença de FR nos pacientes com AR e especialmente o próprio contexto inflamatório de cada grupo pode ter influência nos níveis de sFasL observados no presente estudo.

Conforme mencionado anteriormente, hipotetiza-se que a presença das moléculas sFas e sFasL no líquido sinovial e no plasma de pacientes com AR seja um dos principais fatores envolvidos na desregulação dos eventos de apoptose observada nesses pacientes. Os resultados evidenciados na análise dos fatores solúveis condizem com nossos achados moleculares, especialmente no que diz respeito ao gene *FAS*. Demonstramos uma relação do genótipo AA do polimorfismo *FAS* -670 com aumento do risco de desenvolvimento de AR. A presença do alelo A está associada a uma maior transcrição do gene (HONG *et al.*, 2015; TREVIÑO-TALAVERA *et al.*, 2014), o que poderia explicar, pelo menos em parte, os níveis elevados de sFas observados no grupo de pacientes com AR.

Na análise de citocinas, destacaram-se os níveis elevados de IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  nos indivíduos com AR quando comparados aos indivíduos com OA. A presença de níveis elevados tanto de citocinas pró-inflamatórias (como IL-6 e TNF- $\alpha$ ) quanto anti-inflamatórias (IL-10) ressalta a intrincada rede de moléculas que atua na patogênese da doença. Adicionalmente, o aumento dos níveis de IL-10 pode estar relacionado a uma

resposta do organismo em direção a homeostase, frente a um processo inflamatório exacerbado. Por fim, não foi observada correlação entre os níveis de citocinas e os níveis de sFas e sFasL, indicando que esses atuam de forma independente, porém complementar, na patofisiologia da AR.

A partir dos dados obtidos, novos trabalhos poderão ser desenvolvidos a fim de complementar o entendimento da atuação dessas moléculas no contexto da AR. Como perspectivas futuras, citamos a análise do perfil de células NK em pacientes com AR e pacientes com OA por citometria de fluxo. Análises celulares permitirão uma avaliação quantitativa e qualitativa do perfil fenotípico das células NK na AR bem como as taxas de apoptose específicas destas células e os perfis de moléculas envolvidas nesse processo. Ao longo do doutorado, tentamos elucidar tais questões, no entanto, algumas dificuldades e limitações inviabilizaram a realização da abordagem celular: i) o número de pacientes com indicação ao procedimento de infiltração foi menor do que o previsto inicialmente pela equipe médica e de pesquisadores envolvidos no estudo; ii) os critérios de inclusão estabelecidos como ausência de outras doenças autoimunes e não estar sob tratamento de imunobiológicos refletiram em uma grande redução do número de indivíduos elegíveis; iii) a quantidade de células disponíveis em líquido sinovial, especialmente em pacientes com OA, foi insuficiente para a realização das análises propostas.

Ao investigarmos o sangue periférico de dois pacientes com OA, observamos um maior percentual de população CD56<sup>dim</sup> comparada à população de CD56<sup>bright</sup>, conforme esperado. Ao compararmos o perfil das células NK em líquido sinovial e sangue periférico de indivíduo com AR foi possível observar um acúmulo de células CD56<sup>bright</sup> no líquido sinovial em relação ao sangue periférico do mesmo paciente (Anexo 1. Figuras 10 até 12). Cabe ressaltar, que apesar desta avaliação representar uma análise exploratória preliminar, ela sugere a existência de diferenças importantes entre compartimentos biológicos e possivelmente entre as duas patologias. Para contornar as dificuldades encontradas sugere-se: i) o recrutamento de pacientes com diagnóstico recente de AR e OA, tentando desta forma, minimizar os possíveis efeitos supressores do tratamento sobre o número de células presentes na articulação; ii) a continuidade de coleta de líquido sinovial de pacientes que sofreram trauma de joelho para compor o grupo controle juntamente com indivíduos OA; iii) a inclusão de novos centros para o recrutamento de

participantes, com a finalidade de ampliar o número de indivíduos passíveis de recrutamento.

Ainda, é importante mencionar o desenvolvimento de outras atividades científicas que excedem o tema explorado na presente tese, mas que, no entanto, contribuem significativamente para a formação de conhecimento ao longo do período acadêmico do doutorado.

Dentro da temática da imunogenética de doenças autoimunes, foram produzidos dois trabalhos relacionados a avaliação da influência de fatores genéticos na susceptibilidade ao LES. O primeiro intitulado “*Evaluation of polymorphic variants in apoptotic genes and their role in susceptibility and clinical progression to systemic lupus erythematosus*” de autoria de Glesse et al., (2017) encontra-se apresentado *in extenso* como anexo pela sua íntima relação com o tema apresentado nesta tese de doutorado (Anexo 2). O segundo trabalho, encontra-se em fase de preparação e intitula-se “*Influence of polymorphic variants in NKG2 genes and their role in systemic lupus erythematosus susceptibility and clinical progression*”. Os resultados preliminares deste estudo estão dispostos no anexo 3. Por fim, cabe ainda citar a co-orientação do trabalho de conclusão de curso da aluna Brenda Beltrame no Curso Biomedicina - UFRGS. “Relação da deleção do gene NKG2C e haplótipos de HLA-E com a susceptibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico”, o qual está em desenvolvimento.

Os demais trabalhos desenvolvidos referem-se à imunologia e imunogenética da infecção pelo HIV-1. Esses trabalhos estão inseridos no contexto de linhas de pesquisa sólidas do laboratório de Imunobiologia e Imunogenética da UFRGS, contudo, por não se relacionarem diretamente à temática central dessa tese, serão apresentados apenas seus resumos. Dois desses estudos foram publicados em periódicos internacionais (Anexo 4 e 5), sendo um de autoria principal compartilhada.

A partir da revisão da literatura relacionada a polimorfismos em *NKG2*, identificou-se apenas um estudo relacionando o papel da deleção de *NKG2C* na susceptibilidade ao HIV e progressão à AIDS (THOMAS et al., 2012). Esse fato motivou a produção do trabalho “*Influence of NKG2C Deletion on HIV-1 Infected Patients susceptibility*” que se encontra em preparação. Nesse estudo, não foi observada diferenças

significativas na frequência da deleção de *NKG2C* entre 410 pacientes HIV+ e 553 indivíduos não-infectados.

Por fim, consideramos que o trabalho desenvolvido traz importantes contribuições para o conhecimento da imunogenética das doenças autoimunes. Investigamos o papel de variantes genéticas pouco exploradas na literatura na susceptibilidade a AR, identificando polimorfismos candidatos a serem usados como marcadores biológicos de susceptibilidade e severidade da doença. As análises dos fatores solúveis corroboram o papel das moléculas Fas e FasL na patofisiologia da doença bem como destacam o papel das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  no processo inflamatório associado à AR.

## REFERÊNCIAS

AGGARWAL, A.; SHARMA, A.; BHATNAGAR, A. Role of cytolytic impairment of natural killer and natural killer T-cell populations in rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 33, n. 8, p. 1067–1078, 2014.

AHERN, D. J.; BRENNAN, F. M. The role of Natural Killer cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: major contributors or essential homeostatic modulators? **Immunology letters**, v. 136, n. 2, p. 115–21, 2011.

ALARCON, R. T.; ANDRADE, L. E. C. Anticorpos antiproteínas citrulinadas e a artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, n. 3, p. 180–187, 2007.

ALDAHLAWI, A. M. et al. Chemokine receptors expression on peripheral CD4-lymphocytes in rheumatoid arthritis: Coexpression of CCR7 and CD95 is associated with disease activity. **Saudi journal of biological sciences**, v. 22, n. 4, p. 453–8, 2015.

ALETAHA, D. et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis and Rheumatism**, v. 62, n. 9, p. 2569–2581, 2010.

ALETAHA, D.; BLÜML, S. Therapeutic implications of autoantibodies in rheumatoid arthritis. **RMD open**, v. 2, n. 1, p. e000009, 2016.

ARAMAKI, T. et al. A significantly impaired natural killer cell activity due to a low activity on a per-cell basis in rheumatoid arthritis. **Modern Rheumatology**, v. 19, n. 3, p. 245–252, 2009.

ASHKENAZI, A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 12, p. 1001–1012, 2008.

ASHKENAZI, A. et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 4, p. 273–284, 2017.

ASSMANN, G. et al. Association of rheumatoid arthritis with Mdm2 SNP309 and genetic evidence for an allele-specific interaction between MDM2 and p53 P72R variants: a case control study. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 27, n. 4, p. 615–9, 2009.

AUDO, R. et al. Distinct effects of soluble and membrane-bound Fas ligand on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. **Arthritis and Rheumatology**, v. 66, n. 12, p. 3289–3299, 2014.

BARTEL, Y.; BAUER, B.; STEINLE, A. Modulation of NK cell function by genetically coupled C-type lectin-like receptor/ligand pairs encoded in the human natural killer gene complex. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. NOV, p. 1–10, 2013.

BIEGING, K. T.; MELLO, S. S.; ATTARDI, L. D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 5, p. 359–370, 2014.

BJÖRKSTRÖM, N. K.; LJUNGGREN, H.-G.; MICHAËLSSON, J. Emerging insights into natural killer cells in human peripheral tissues. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 5, p. 310–320, 2016.



- BOLLAIN-Y-GOYTIA, J. J. et al. Soluble Fas and the -670 polymorphism of Fas in lupus nephritis. **International Journal of Nephrology**, v. 2014, 2014.
- BORREGO, F. et al. The CD94/NKG2 family of receptors: From molecules and cells to clinical relevance. **Immunologic Research**, v. 35, n. 3, p. 263–277, 2006.
- BRENOL, C. V. et al. Artrite reumatóide e aterosclerose. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 5, p. 465–470, 2007.
- BROWN, J. M.; ATTARDI, L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. March, p. 1–8, 2005.
- CALIGIURI, M. A. Human natural killer cells. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 461–469, 2008.
- CALMON-HAMATY, F. et al. Targeting the Fas/FasL system in Rheumatoid Arthritis therapy: Promising or risky? **Cytokine**, v. 75, n. 2, p. 228–233, 2015.
- CASTRO-SANTOSA, P.; DÍAZ-PEÑA, R. Genética da artrite reumatoide: É necessário um novo impulso em populações latino-americanas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 2, p. 171–177, 2016.
- CAVANAUGH, V. J.; RAULET, D. H.; CAMPBELL, A. E. Upregulation of CD94/NKG2A receptors and Qa-1b ligand during murine cytomegalovirus infection of salivary glands. **The Journal of general virology**, v. 88, n. Pt 5, p. 1440–5, 2007.
- CHALAN, P. et al. Altered natural killer cell subsets in seropositive arthralgia and early rheumatoid arthritis are associated with autoantibody status. **Journal of Rheumatology**, v. 43, n. 6, p. 1008–1016, 2016.
- CHAN, A. et al. CD56bright Human NK Cells Differentiate into CD56dim Cells: Role of Contact with Peripheral Fibroblasts. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 179, n. 1, p. 89–94, 2007.
- CHOU, C. T.; YANG, J. S.; LEE, M. R. Apoptosis in rheumatoid arthritis - Expression of Fas, Fas-L, p53, and Bcl-2 in rheumatoid synovial tissues. **Journal of Pathology**, v. 193, n. 1, p. 110–116, 2001.
- CHOY, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 51 Suppl 5, p. v3-11, 2012.
- CONIGLIARO, P. et al. Restoration of peripheral blood natural killer and B cell levels in patients affected by rheumatoid and psoriatic arthritis during etanercept treatment. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 177, n. 1, p. 234–243, 2014.
- DA MOTA, L. M. H. et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 52, n. 2, 2012.
- DA MOTA, L. M. H. et al. Diretrizes para o diagnóstico da artrite reumatoide. **Rev Bras Reumatol.**, v. 53, n. 2, p. 141–157, 2013.
- DA MOTA, L. M. H.; LAURINDO, I. M. M.; NETO, L. L. dos S. Princípios gerais do tratamento da artrite reumatoide inicial. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, n. 3, p. 360–362, 2010a.

- DA MOTA, L. M.; LAURINDO, I. M. M.; NETO, L. L. D. S. Artrite reumatoide inicial - conceitos. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, n. 2, p. 227–9, 2010b.
- DALBETH, N. et al. CD56<sup>bright</sup> NK Cells Are Enriched at Inflammatory Sites and Can Engage with Monocytes in a Reciprocal Program of Activation. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 10, p. 6418–6426, 2004.
- DALBETH, N.; CALLAN, M. F. C. A subset of natural killer cells is greatly expanded within inflamed joints. **Arthritis and rheumatism**, v. 46, n. 7, p. 1763–72, 2002.
- DE CAMPOS, O. A. M. et al. Assessment of cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis using the SCORE risk index. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, v. 56, n. 2, p. 138–144, 2016.
- DE MATOS, C. T. et al. Activating and inhibitory receptors on synovial fluid natural killer cells of arthritis patients: role of CD94/NKG2A in control of cytokine secretion. **Immunology**, v. 122, n. 2, p. 291–301, 2007.
- DUMONT, P. et al. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. **Nature genetics**, v. 33, p. 357–365, 2003.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.
- ESPINOZA, J. L. et al. A functional polymorphism in the NKG2D gene modulates NK-cell cytotoxicity and is associated with susceptibility to Human Papilloma Virus-related cancers. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–12, 2016.
- FAVALORO, B. et al. Role of Apoptosis in disease.pdf. **Aging**, v. 4, n. 5, p. 330–349, 2012.
- FESIK, S. W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 11, p. 876–885, 2005.
- FIRESTEIN, G. S. et al. Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. **The American journal of pathology**, v. 149, n. 6, p. 2143–51, 1996.
- FIRESTEIN, G. S. et al. Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 20, p. 10895–900, 1997.
- FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 356–61, 2003.
- FIRESTEIN, G. S.; MCINNES, I. B. Review Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Immunity**, v. 46, n. 2, p. 183–196, 2017.
- FIRESTEIN, G. S.; YEO, M.; ZVAIFLER, N. J. Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium. **The Journal of clinical investigation**, v. 96, n. 3, p. 1631–8, 1995.
- FUGGER, L.; SVEJGAARD, A.; SYGEHUS, S. Association of MHC and rheumatoid arthritis : studies in mice and men HLA-DR4 and rheumatoid arthritis. **Arthritis research**, v. 2, n. 3, p. 208-11, 2000.

- FURUE, H. et al. Opposite impact of NKG2D genotype by lifestyle exposure to risk of aerodigestive tract cancer among Japanese. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 1, p. 181–186, 2008.
- GAO, J. et al. MicroRNA-126 targeting PIK3R2 promotes rheumatoid arthritis synovial fibro-blasts proliferation and resistance to apoptosis by regulating PI3K/AKT pathway. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 100, n. 1, p. 192–198, 2016.
- GOELDNER, I. et al. Artrite reumatoide : uma visão atual. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 5, p. 495–503, 2011.
- GONCALVES, A. et al. Differential frequency of NKG2C/KLRC2 deletion in distinct African populations and susceptibility to Trachoma: a new method for imputation of KLRC2 genotypes from SNP genotyping data. **Human Genetics**, v. 135, n. 8, p. 939–951, 2016.
- GROH, V. et al. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 16, p. 9452–9457, 2003.
- GUNTURI, A.; BERG, R. E.; FORMAN, J. Preferential survival of CD8 T and NK cells expressing high levels of CD94. **The Journal of Immunology**, v. 170, p. 1737–1745, 2003.
- HAYASHI, T. et al. Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. **Cancer Research**, v. 66, n. 1, p. 563–570, 2006.
- HIKAMI, K. et al. Variations of human killer cell lectin-like receptors: common occurrence of NKG2-C deletion in the general population. **Genes and immunity**, v. 4, n. 2, p. 160–7, 2003.
- HIZEM, S. et al. Polymorphisms in Genes Coding for the NK-Cell Receptor NKG2D and its Ligand MICA in Recurrent Miscarriage. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 72, p. 577–585, 2014.
- HONG, S. et al. TNF- $\alpha$  confers resistance to Fas-mediated apoptosis in rheumatoid arthritis through the induction of soluble Fas. **Life Sciences**, v. 122, p. 37–41, 2015.
- HUANG, Q. R. et al. Evaluation of a new Apo-1/Fas promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. **Rheumatology**, v. 38, n. 7, p. 645–51, 1999.
- HUANG, Q. R.; MORRIS, D.; MANOLIOS, N. Identification and characterisation of polymorphisms in the promoter region of the human Apo-1/Fas (CD95) gene. **Molecular Immunology**, v. 34, n. 8–9, p. 577–582, 1997.
- IDA, H. et al. CD94 ligation induces apoptosis in a subset of IL-2-stimulated NK cells. **Journal of immunology**, v. 159, n. 5, p. 2154–60, 1997.
- IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and Anti-Death: Tumour Resistance To Apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277–288, 2002.

- ISOMÄKI, P. et al. Expression of bcl-2 in rheumatoid arthritis. **British journal of rheumatology**, v. 35, n. 7, p. 611–9, 1996.
- IWASZKO, M. et al. Influence of CD94 and NKG2A variants on susceptibility to rheumatoid arthritis and efficacy of anti-TNF treatment. **Joint, bone, spine**, v. 83, n. 1, p. 75–79, 2016.
- IWASZKO, M.; BOGUNIA-KUBIK, K. Clinical significance of the HLA-E and CD94/NKG2 interaction. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 59, n. 5, p. 353–67, 2011.
- KABALAK, G. et al. Association of an NKG2D gene variant with systemic lupus erythematosus in two populations. **Human immunology**, v. 71, n. 1, p. 74–8, 2010.
- KIM, E. Y.; MOUDGIL, K. D. Immunomodulation of autoimmune arthritis by pro-inflammatory cytokines. **Cytokine**, v. 98, n. February, p. 87–96, 2017.
- KOBAK, S.; BERDELI, A. Fas/FasL promoter gene polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. **Reumatismo**, v. 64, n. 6, p. 374–379, 2012.
- KOMAKI, S. et al. The polymorphic 43Thr bcl-2 protein confers relative resistance to autoimmunity: an analytical evaluation. **Hum Genet.**, v. 103, n. 4, p. 435–40, 1998.
- LAURINDO, I. M. M. et al. Artrite reumatóide: Diagnóstico e Tratamento. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 44, n. 6, p. 435–442, 2004.
- LE GALLO, M. et al. CD95/Fas, non-apoptotic signaling pathways, and kinases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. SEP, 2017.
- LEE, D. M.; WEINBLATT, M. E. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 358, n. 9285, p. 903–11, 2001.
- LEE, S.-Y. et al. IL-17-mediated Bcl-2 expression regulates survival of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis through STAT3 activation. **Arthritis Research and Therapy**, v. 15, n. 1, p. R31, 2013.
- LEE, Y. H. et al. p53 Codon 72 Polymorphism and Rheumatoid Arthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 28, n. 11, 2001.
- LEE, Y. H. et al. Associations between the FAS -670A/G and -1,377 G/A polymorphisms and susceptibility to autoimmune rheumatic diseases: a meta-analysis. **Mol Biol Rep**, v. 39, p. 10671–10679, 2012a.
- LEE, Y. H. et al. Associations between the p53 codon 72 polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a meta-analysis. **Lupus**, v. 21, n. 4, p. 430–437, 2012b.
- LEE, Y. H.; BAE, S. C.; SONG, G. G. Association between the CTLA-4, CD226, FAS polymorphisms and rheumatoid arthritis susceptibility: A meta-analysis. **Human Immunology**, v. 76, n. 2–3, p. 83–89, 2015.
- LI, L. et al. NKG2C copy number variations in five distinct populations in mainland China and susceptibility to nasopharyngeal carcinoma ( NPC ). **Human Immunology**, v. 76, n. 2–3, p. 90–94, 2015.

- LI, X. et al. Effect of CD95 on inflammatory response in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Cellular Immunology**, v. 290, n. 2, p. 209–216, 2014.
- LIAO, K.; ALFREDSSON, L.; KARLSON, E. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 21, n. 3, p. 279–283, 2010.
- LIU, H.; POPE, R. M. The role of apoptosis in rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 317–322, 2003.
- LÓPEZ-MEJÍAS, R. et al. Cardiovascular risk assessment in patients with rheumatoid arthritis: The relevance of clinical, genetic and serological markers. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 11, p. 1013–1030, 2016.
- MA, J. et al. Association of NKG2D Genetic Polymorphism with Susceptibility to Chronic Hepatitis B in a Han Chinese Population. **Journal of Medical Virology**, v. 82, p. 1501–1507, 2010.
- MA, X.; XU, S. TNF inhibitor therapy for rheumatoid arthritis. **Biomedical Reports**, v. 1, n. 2, p. 177–184, 2012.
- MACCHIONI, P. et al. The codon 72 polymorphic variants of p53 in Italian rheumatoid arthritis patients. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 25, n. 3, p. 416–421, 2007.
- MARCHENKO, N. D.; ZAIKA, A.; MOLL, U. M. Death Signal-induced Localization of p53 Protein to Mitochondria. v. 275, n. 21, p. 16202–16212, 2000.
- MARIASELVAM, C. M. et al. Association of NKG2D gene variants with susceptibility and severity of Rheumatoid Arthritis. **Clinical and experimental immunology**, p. 369–375, 2016.
- MARQUES-NETO, J.F. et al. Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide do adulto em amostras da população brasileira. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 33, n. 5, p. 169–73, 1993.
- MATAKIDOU, A.; EISEN, T.; HOULSTON, R. TP53 polymorphisms and lung cancer risk : a systematic review and. **Mutagenesis**, v. 18, n. 4, p. 377–385, 2003.
- MATLASHEWSKI, G. J. et al. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. **Molecular and Cellular Biology**, v. 7, n. 2, p. 961–3, 1987.
- MCINNES, I. B.; LEUNG, B. P.; LIEW, F. Y. Cell-cell interactions in synovitis. Interactions between T lymphocytes and synovial cells. **Arthritis research**, v. 2, n. 5, p. 374–8, 2000.
- MCINNES, I.; SCHETT, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 23, p. 2205–19, 2011.
- MEKA, P. B. et al. Influence of BCL2-938 C>A promoter polymorphism and BCL2 gene expression on the progression of breast cancer. **Tumor Biology**, v. 37, n. 5, p. 6905–6912, 2016.
- MELUM, E. et al. Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis is associated

- with NKG2D polymorphisms. **Hepatology**, v. 47, n. 1, p. 90–96, 2008.
- MIDDLETON, D.; CURRAN, M.; MAXWELL, L. Natural killer cells and their receptors. **Transplant Immunology**, v. 10, n. 2–3, p. 147–164, 2002.
- MIYADERA, H.; TOKUNAGA, K. Associations of human leukocyte antigens with autoimmune diseases: Challenges in identifying the mechanism. **Journal of Human Genetics**, v. 60, n. 11, p. 697–702, 2015.
- MIYASHITA, R. et al. Molecular genetic analyses of human NKG2C (KLRC2) gene deletion. **International Immunology**, v. 16, n. 1, p. 163–168, 2004.
- MOHAMMADZADEH, A. et al. Evaluation of apoptosis-related gene Fas ( CD95 ) and FasL ( CD178 ) polymorphisms in Iranian rheumatoid arthritis patients. **Rheumatol Int**, v. 32, p. 2833–2836, 2012.
- MOODLEY, D.; MODY, G.; CHUTURGOON, A. Functional analysis of the p53 codon 72 polymorphism in black South Africans with rheumatoid arthritis—a pilot study. **Clinical rheumatology**, p. 1099–1105, 2010.
- MORAIS, R. S. et al. Artrite reumatoide: revisão dos aspectos imunológicos. **Estudos**, v. 41, n. 3, p. 591–601, 2014.
- MORARU, M. et al. Assessment of copy-number variation in the NKG2C receptor gene in a single-tube and characterization of a reference cell panel, using standard polymerase chain reaction. **Tissue antigens**, v. 80, n. 2, p. 184–7, 2012.
- MOUDI, B. et al. Association of FAS and FAS ligand genes polymorphism and risk of systemic lupus erythematosus. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.
- MOURA, M. C. et al. Perfil dos pacientes com manifestações extraarticulares de artrite reumatoide de um serviço ambulatorial em Curitiba, Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 5, p. 686–694, 2012.
- MÜLLER-LADNER, U.; NISHIOKA, K. P53 in rheumatoid arthritis: Friend or foe? **Arthritis Research**, v. 2, n. 3, p. 175–178, 2000.
- MUNTASELL, A. et al. Relationship of NKG2C Copy Number with the Distribution of Distinct Cytomegalovirus-Induced Adaptive NK Cell Subsets. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 9, p. 3818–3827, 2016.
- NAGATA, S.; TANAKA, M. Programmed cell death and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 5, p. 333–340, 2017.
- NOYOLA, D. E. et al. Influence of congenital human cytomegalovirus infection and the NKG2C genotype on NK-cell subset distribution in children. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 12, p. 3256–3266, 2012.
- NÜCKEL, H. et al. Association of a novel regulatory polymorphism (-938C>A ) in the BCL2 gene promoter with disease progression and survival in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 109, n. 1, p. 290–297, 2007.
- PARK, K. S.; PARK, J. H.; SONG, Y. W. Inhibitory NKG2A and activating NKG2D and NKG2C natural killer cell receptor genes: susceptibility for rheumatoid arthritis.

**Tissue antigens**, v. 72, n. 4, p. 342–6, 2008.

PEGRAM, H. J. et al. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. **Immunology and Cell Biology**, v. 89, n. 2, p. 216–224, 2011.

PENG, S. L. Fas (CD95)-related apoptosis and rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 45, n. 1, p. 26–30, 2006.

PERRICONE, C.; CECCARELLI, F.; VALESINI, G. An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story. **Autoimmunity reviews**, v. 10, n. 10, p. 599–608, 2011.

PINHEIRO, G. da R. C. Instrumentos de medida da atividade da artrite reumatoide - Por que e como empregá-los. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, n. 5, p. 362–365, 2007.

PIOTROWSKI, P.; LIANERI, M. Prevalence of the NKG2D Thr72Ala polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus. p. 1343–1347, 2012.

POPE, R. M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 7, p. 527–35, 2002.

POPKO, K.; GÓRSKA, E. The role of natural killer cells in pathogenesis of autoimmune diseases. **Central European Journal of Immunology**, v. 4, n. 4, p. 470–476, 2015.

PRIDGEON, C. et al. Natural killer cells in the synovial fluid of rheumatoid arthritis patients exhibit a CD56bright, CD94bright, CD158negative phenotype. **Rheumatology**, v. 42, n. 7, p. 870–878, 2003.

RAZA, K. et al. Synovial fluid leukocyte apoptosis is inhibited in patients with very early rheumatoid arthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 8, n. 4, p. 1–7, 2006.

REN, J. et al. Natural killer-22 cells in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis are an innate source of interleukin 22 and tumor necrosis factor- $\alpha$ . **Journal of Rheumatology**, v. 38, n. 10, p. 2112–2118, 2011.

RICHTER, J. et al. CD161 receptor participates in both impairing NK cell cytotoxicity and the response to glycans and vimentin in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Immunology**, v. 136, n. 1, p. 139–147, 2010.

ROSZAK, A.; LIANERI, M.; JAGODZIŃSKI, P. P. Prevalence of the NKG2D Thr72Ala polymorphism in patients with cervical carcinoma. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 16, n. 8, p. 841–5, 2012.

SABAPATHY, K.; LANE, D. P. Therapeutic targeting of p53: All mutants are equal, but some mutants are more equal than others. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 1, p. 13–30, 2018.

SAHIN, M. et al. Serum soluble Fas levels in patients with autoimmune rheumatic diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 40, n. 1–2, p. 6–10, 2007.

SALMON, M. et al. Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 3, p. 439–446, 1997.

- SENNA, É. R. et al. Prevalence of Rheumatic Diseases in Brazil : A Study Using the COPCORD Approach. **The Journal of rheumatology**, v. 31, n. 3, p. 594–597, 2004.
- SEO, J. et al. Association of CD94/NKG2A, CD94/NKG2C, and its ligand HLA-E polymorphisms with Behcet’s disease. **Tissue antigens**, v. 70, n. 4, p. 307–13, 2007.
- SHAPIRA, Y.; AGMON-LEVIN, N.; SHOENFELD, Y. Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases. **Nat Rev Rheumatol.**,v. 6, n. 8, p. 468–476, 2010.
- SHEGARFI, H.; NADDAFI, F.; MIRSHAFIEY, A. Natural Killer Cells and Their Role in Rheumatoid Arthritis: Friend or Foe? **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–10, 2012.
- SHI, F. D.; LJUNGGREN, H. G.; SARVETNICK, N. Innate immunity and autoimmunity: From self-protection to self-destruction. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 2, p. 97–101, 2001.
- SHIBATOMI, K. et al. A novel role for interleukin-18 in human natural killer cell death: high serum levels and low natural killer cell numbers in patients with systemic autoimmune diseases. **Arthritis and rheumatism**, v. 44, n. 4, p. 884–92, 2001.
- SHIOZAWA, S. et al. Pathogenesis of joint destruction in rheumatoid arthritis. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 59, n. 2, p. 89–95, 2011.
- SHUM, B. P. et al. Conservation and Variation in Human and Common Chimpanzee CD94 and NKG2 Genes. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 1, p. 240–252, 2002.
- SILVERMAN, G. J.; CARSON, D. A. Roles of B cells in rheumatoid arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 5 Suppl 4, p. S1-6, 2003.
- SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 388, n. 10055, p. 2023–2038, 2016.
- SNYDER, M. R.; WEYAND, C. M.; GORONZY, J. J. The double life of NK receptors: Stimulation or co-stimulation? **Trends in Immunology**, v. 25, n. 1, p. 25–32, 2004.
- STRAND, V.; KIMBERLY, R.; ISAACS, J. D. Biologic therapies in rheumatology: Lessons learned, future directions. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 1, p. 75–92, 2007.
- SZODORAY, P. et al. Programmed Cell Death in Rheumatoid Arthritis Peripheral Blood T-Cell Subpopulations Determined by Laser Scanning Cytometry. **Laboratory Investigation**, v. 83, n. 12, p. 1839–1848, 2003.
- THOMAS, R. et al. NKG2C Deletion Is a Risk Factor of HIV Infection. v. 28, n. 8, p. 844–851, 2012.
- TOBÓN, G. J.; YOUINO, P.; SARAUX, A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. **Journal of autoimmunity**, v. 35, n. 1, p. 10–4, 2010.
- TREVIÑO-TALAVERA, B. A. et al. FAS -670A > G promoter polymorphism is associated with soluble Fas levels in primary Sjögren’s syndrome. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 4831–4838, 2014.



- TSUJIMOTO, Y. et al. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. **Science**, v. 228, n. 4706, p. 1440–3, 1985.
- VAN DER GEEST, K. S. M. et al. SF treg cells transcribing high levels of Bcl-2 and microRNA-21 demonstrate limited apoptosis in RA. **Rheumatology**, v. 54, n. 5, p. 950–958, 2014.
- VILCHEZ, J. R. et al. Evaluation of the association of NKG2C copy number variations with susceptibility to human papillomavirus-induced cervical lesions. **Human immunology**, v. 74, n. 10, p. 1352–6, 2013.
- VIVIER, E. et al. Functions of natural killer cells. **Nature Immunology**, v. 9, n. 5, p. 503–510, 2008.
- VOUSDEN, K. H.; LANE, D. P. P53 in Health and Disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 4, p. 275–283, 2007.
- WALSH, C. E. et al. Differential expression of NK receptors CD94 and NKG2A by T cells in rheumatoid arthritis patients in remission compared to active disease. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e27182, 2011.
- WANG, W. et al. Role of polymorphisms in BCL-2 and BAX genes in modulating the risk of developing non-Hodgkin lymphoma. **Leuk Lymphoma.**, v. 55, n. 7, p. 1602–8, 2014.
- 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. **The Journal of Immunology**, v. 170, p. 132–138, 2017.
- YAMADA, A. et al. Dual role of Fas/FasL-mediated signal in peripheral immune tolerance. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1–10, 2017.
- YAMANISHI, Y. et al. Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 15, p. 10025–30, 2002.
- YEN, J. H. et al. Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. **The Journal of experimental medicine**, v. 193, n. 10, p. 1159–1167, 2001.
- YILDIR, S.; SEZGIN, M.; ERDAL, M. E. Relation of the Fas and FasL gene polymorphisms with susceptibility to and severity of rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int**, v. 33, p. 2637–2645, 2013.
- YOUNG, A.; KODURI, G. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. **Best Practice and Research: Clinical Rheumatology**, v. 21, n. 5, p. 907–927, 2007.
- ZHANG, T. et al. p53 predominantly regulates IL-6 production and suppresses synovial inflammation in fibroblast-like synoviocytes and adjuvant-induced arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 18, n. 1, p. 271, 2016.
- ZHANG, X. et al. Role of Bcl-2 -938 C>A polymorphism in susceptibility and

prognosis of cancer: a meta-analysis. **Scientific Reports**, v.28, n. 4, p. 7241, 2014.

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. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. 5596–5602, 2006.

ZHU, A. et al. Fas/FasL, Bcl2 and Caspase-8 gene polymorphisms in Chinese patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology international**, v. 36, n. 6, p. 807–18, 2016.

ZILFOU, J. T.; LOWE, S. W. Tumor suppressive functions of p53. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 5, p. 1–12, 2009.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Resultados preliminares de análises do perfil das células NK por citometria de fluxo em sangue periférico e líquido sinovial de pacientes com AR e OA.

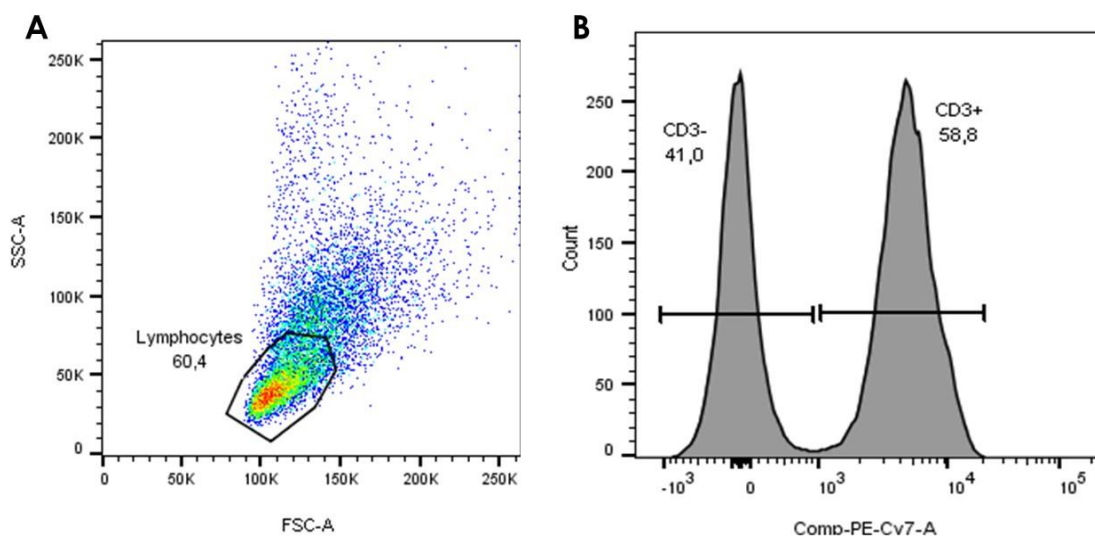


Figura 10: Resultados preliminares de análises do perfil das células NK por citometria de fluxo em sangue periférico e líquido sinovial de pacientes com AR e osteoartrite. A) Seleção da população de linfócitos baseada na relação tamanho e granulosidade. B) Diferenciação de células quanto à expressão de CD3, com posterior seleção de células CD3-.

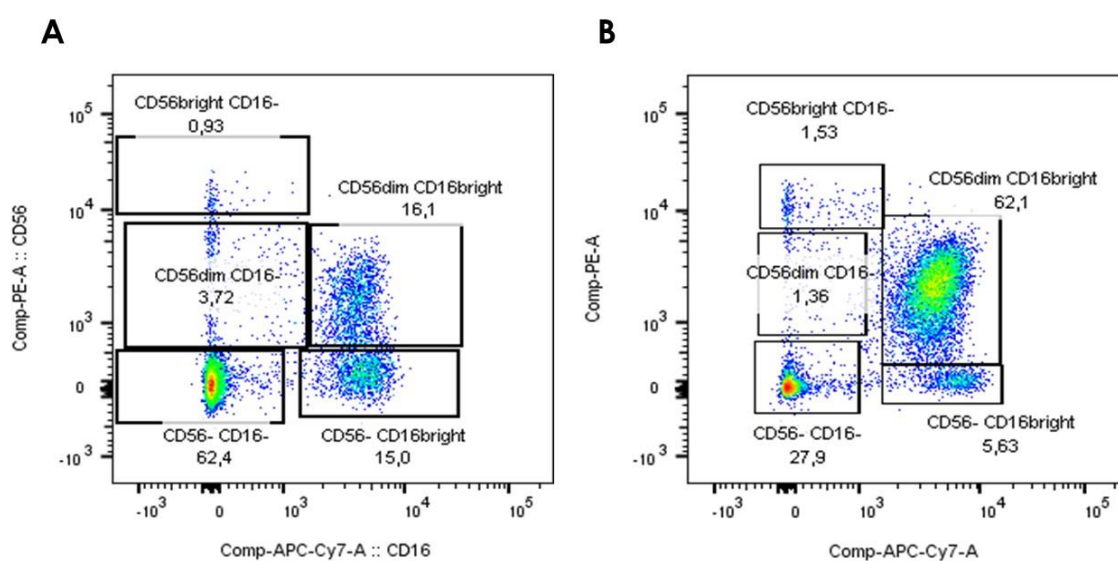


Figura 11. Análise do perfil de células NK (CD3- CD56+) em sangue periférico de dois pacientes com osteoartrite (OA). Figura A) amostra OA01 B) amostra OA02. Observa-se maior percentual de população CD56<sup>dim</sup> comparado a população de CD56<sup>bright</sup>.

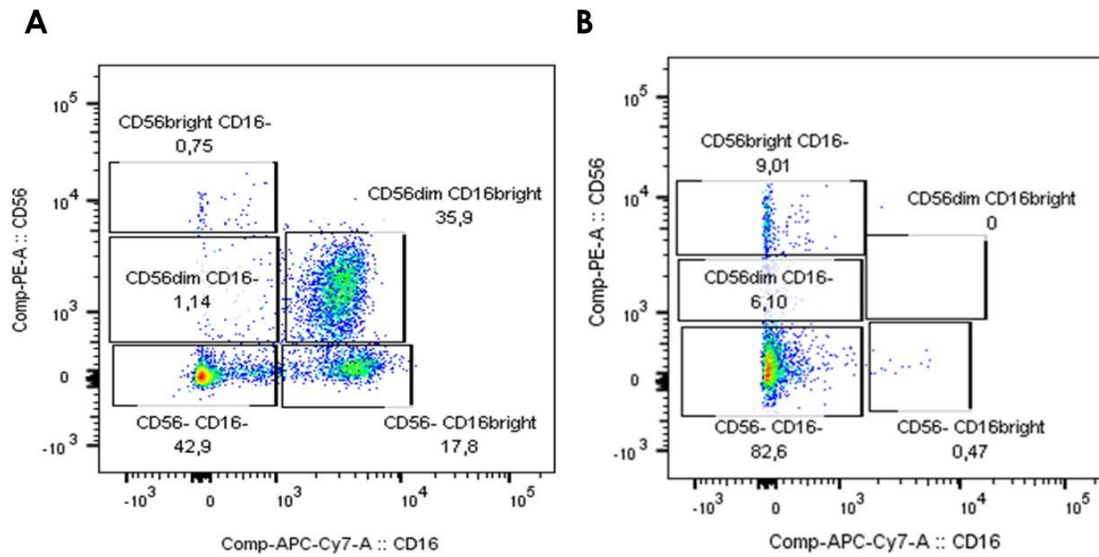


Figura 12: Análise do perfil de células NK em sangue periférico (A) e líquido sinovial (B) de pacientes com AR. Observa-se maior percentual de células CD56<sup>bright</sup> em líquido sinovial e maior percentual de células CD56<sup>dim</sup> em sangue periférico.

### PAPER

## Evaluation of polymorphic variants in apoptotic genes and their role in susceptibility and clinical progression to systemic lupus erythematosus

N Glesse<sup>1</sup>, P Vianna<sup>1</sup>, LMG Paim<sup>1</sup>, MCC Matte<sup>1</sup>, AKK Aguiar<sup>1</sup>, PL Palhano<sup>1</sup>, OA Monticelo<sup>2</sup>, CV Breno<sup>2</sup>, RM Xavier<sup>2</sup> and JAB Chies<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Immunogenetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; and <sup>2</sup>Division of Rheumatology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

**Background:** 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. Evidence suggests that abnormalities in the cellular and molecular events that coordinate apoptosis may favour the generation of autoantigens involved in autoimmunity. In this way, the apoptotic deregulation may be affected by polymorphic variants in apoptotic-related genes. **Methods:** We analyzed *FAS*, *FASL*, *BCL-2* and *BAX* polymorphisms in order to correlate to SLE susceptibility and clinical features. A total of 427 SLE patients from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and 543 controls from southern Brazil were evaluated. **Results:** 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, favouring autoantibody 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. The rate of apoptosis and cell death was evaluated in peripheral lymphocytes, and SLE patients presented a higher percentage of dead lymphocytes (CD3<sup>+</sup>Annexin V<sup>+</sup>7-AAD<sup>+</sup>) compared to the control group. **Conclusion:** Our data support a role for apoptosis in SLE susceptibility. *Lupus* (2017) 26, 746–755.

**Key words:** 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.<sup>1,2</sup> 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.<sup>2,3</sup> SLE predominantly affects women, with a peak around 30 years of age, and the rate of women to men is 9:1. Furthermore, 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.<sup>4</sup>

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.<sup>5,6</sup> Apoptosis has attracted the attention of researchers since it can potentially be a major source of autoantigens in SLE.<sup>7</sup> Apoptosis is

Correspondence to: José Artur Bogo Chies, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratory of Immunogenetics, Institute of Biosciences, Department of Genetics, Bento Gonçalves Avenue – 9500, Campus do Vale, PO Box 15053, 91501970, Porto Alegre, RS – Brazil.

Email: jabchies@terra.com.br

Received 10 December 2015; accepted 17 October 2016

© The Author(s), 2016. Reprints and permissions: <http://www.sagepub.com/permissions.nav>

10.1177/0961203316678671

critical in normal physiological processes of multicellular organisms, being essential for T and B lymphocyte selection and the regulation of immune responses. An imbalance 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.<sup>7,8</sup> In addition, these defects may be responsible for the initial development of autoimmune conditions as well as by its perpetuation.<sup>5,9</sup>

Apoptosis is regulated by different pathways that involve inhibitory and activating genes.<sup>10</sup> In normal circumstances, an immune response against self-antigens is prevented by mechanisms of apoptosis mediated by the Fas/FasL pathway,<sup>11</sup> which also play important roles in T-cell tolerance and B-cell homeostasis.<sup>12,13</sup> Genetic defects in *FAS* and *FASL* genes highlight the importance of apoptosis in immune tolerance.<sup>2,14</sup> 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.<sup>15,16</sup> 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.<sup>17</sup> The Bcl-2 protein plays a role in the regulation of apoptosis in several cell types including human T and B cells.<sup>18,19</sup> 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 autoantibody production, such as anti-dsDNA and anti-Sm.<sup>20</sup> Bax is a proapoptotic intracellular protein required for intrinsic cell death stimulus, controlling both the selection of lymphocytes from the thymus as well as peripheral lymphoid homeostasis.<sup>21</sup> This protein can form dimers with Bcl-2 or Bcl-xL to reverse its antiapoptotic effects and promote apoptosis.<sup>22</sup>

As 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.<sup>2,15,23,24</sup>

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. Also, the rate of apoptosis in peripheral lymphocytes was measured using AnnexinV binding as an indicator of phosphatidyl serine surface exposure in early apoptotic cells and 7-AAD DNA staining was used as a cell death indicator.

## 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. A subsample composed of 47 SLE and 50 healthy women blood donors was evaluated concerning cell death and early apoptosis in their peripheral lymphocyte compartment. To these last experiments only female patients from European ancestry were included, in order to obtain a highly homogenous sample. 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 colour-based classification criteria used in Brazil is well documented and it has already been assessed by our group in previous studies.<sup>25,26</sup> 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).<sup>27</sup> 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.<sup>28,29</sup> The Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) damage index<sup>30</sup> and systemic lupus erythematosus disease activity index (SLEDAI)<sup>31</sup> 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).

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

| Patient's features       | Whole (427)         | European-derived (318) | African-derived (109) | P value <sup>a</sup> |
|--------------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|
| Whole                    |                     | 74.5%                  | 25.5%                 |                      |
| Women                    | 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                |
| Neurological disorders   | 12.9% (427)         | 13.2% (318)            | 11.9% (109)           | 0.858                |
| Haematological disorders | 76.6% (427)         | 72.6% (318)            | 88.1% (109)           | <b>0.002</b>         |
| Haemolytic anaemia       | 24.1% (427)         | 24.2% (318)            | 23.9% (109)           | 1.000                |
| Leukopenia/lymphopenia   | 62.3% (427)         | 57.9% (318)            | 75.2% (109)           | <b>0.002</b>         |
| Thrombocytopenia         | 18.7% (427)         | 18.2% (318)            | 20.2% (109)           | 0.770                |
| Immunological 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/SS-A             | 43.2% (403)         | 37.6% (298)            | 59.0% (105)           | <0.001               |
| Anti-La/SS-B             | 12.7% (403)         | 10.4% (298)            | 19.0% (105)           | <b>0.034</b>         |
| 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: antiphospholipid syndrome; SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; SLICC: Systemic Lupus International Collaborating Clinics; VDRL: venereal disease research laboratory test.  
<sup>a</sup>Chi-square test for qualitative variables and Mann-Whitney test for quantitative variables.

#### Blood collection and cell preparation

The DNA used for all molecular techniques was obtained from 5 mL of peripheral blood samples collected with ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA) and extracted through the salting-out method described by Lahiri and Nurnberger.<sup>32</sup> DNA samples were stored at -20°C. For the apoptosis analyses, 10 mL of peripheral blood were collected by venipuncture in a second tube with EDTA. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient using Ficoll-hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, St Albans, Herts, UK). After centrifugation, the PBMCs were collected and washed two times in phosphate buffered saline 1X. The cell pellet was suspended in 1 mL of RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) supplemented with 10% of 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). The frequency of early apoptotic and death cells was evaluated, respectively, by using annexin V-FITC and the 7-AAD cell viability dye, both from BD Biosciences (San Diego, CA, USA). All analyses were performed using the software FlowJo 7.5.5 (Tree Star Corporation, Ashland, OR, USA).

#### FAS, FASL, BCL-2 and BAX gene polymorphic variants genotyping

Molecular identification of polymorphisms was performed by polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism 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.<sup>33</sup> The amplified products were digested with *Bst*UI, *Scr*FI and *Bst*DI (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) 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.<sup>34</sup> 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.<sup>35</sup> The PCR products were cleaved with *Bcl*I. The *BAX* -248 G/A polymorphism genotyping was performed according to Moshynska et al.<sup>36</sup> *Acl*I restriction endonuclease was used to cut the PCR product, which was 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) estimates were also calculated. Haplotype frequencies,  $D'$  and  $r^2$  were estimated using MATLAB 7.10 and MLoc programs.<sup>37</sup> Demographic, clinical and laboratory 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

the WinPepi program. The significance level was established at  $P < 0.05$  (two-tailed).

## Results

### Immunogenetic analyses

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. The clinical, demographic and laboratory characteristics of SLE patients are shown in Table 1. The mean age of SLE patients was  $47.84 \pm 14.76$  years and of controls was  $39.02 \pm 11.24$  years. Among the patients, 74.5% were ethnically classified as European-derived although 52.7% of the patients fall into this category, the remaining being considered as African-derived. Among SLE patients, 91.8% of the subjects were women and almost all had positivity for ANA (99.5%). The mean age of onset of symptoms was  $30.52 \pm 13.42$  years while the mean age at SLE diagnosis was  $32.48 \pm 13.62$  years. The most common clinical and laboratory characteristics in SLE patients were arthritis (81.5%), haematological disorders (76.6%), photosensitivity (74.7%) and immunological disorders (69.3%). European-derived SLE patients presented with more photosensitivity than those African-derived (79.9% vs. 59.6%,  $P < 0.001$ ). However, African-derived patients had a higher prevalence of haematological 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 haplotype analysis (data not shown). Results for the *FASL* gene polymorphisms (Table 2) 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 the 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 (95% confidence interval (CI) 2.01-10.13,  $P < 0.001$ ). Moreover, African-derived



**Table 2** 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.

|                            | European-derived              |                               | African-derived   |                               |
|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---|-------------------------------|
|                            | Patients n = 317<br>n (freq.) | Controls n = 284<br>n (freq.) | Patients n = 109<br>n (freq.)                               | Controls n = 231<br>n (freq.) |
| <i>FASL</i> -844 T/C       |                               |                               |   |                               |
| TT <sup>1</sup>            | 60 (0.19)                     | 55 (0.19)                     | 33 (0.30) <sup>a</sup>                                      | 115 (0.50) <sup>a</sup>       |
| CT <sup>2</sup>            | 159 (0.50)                    | 113 (0.40)                    | 54 (0.50)   | 99 (0.43)                     |
| CC <sup>3</sup>            | 98 (0.31)                     | 116 (0.41)                    | 22 (0.20) <sup>b</sup>                                      | 17 (0.07) <sup>b</sup>        |
|                            | <i>P</i> = N/A <sup>c</sup>   |                               | <i>P</i> < 0.001  |                               |
|                            |                               |                               | <sup>1,2</sup> OR 1.90 (95% CI 1.11–3.28) <i>P</i> = 0.038  |                               |
|                            |                               |                               | <sup>1,3</sup> OR 4.51 (95% CI 2.01–10.13) <i>P</i> < 0.001 |                               |
|                            |                               |                               | <sup>2,3</sup> OR 2.37 (95% CI 1.09–5.18) <i>P</i> = 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)                    |
|                            | <i>P</i> = 0.108              |                               | <i>P</i> < 0.001  |                               |
|                            |                               |                               | OR 2.02 (95% CI 1.42–2.86)                                  |                               |
| <i>FASL</i> IVS2nt-124 A/G | <i>n</i> = 306                | <i>n</i> = 278                | <i>n</i> = 108  | <i>n</i> = 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)                      |
|                            | <i>P</i> = 0.619              |                               | <i>P</i> = 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)                     |
|                            | <i>P</i> = 0.993              |                               | <i>P</i> = 0.242  |                               |

<sup>a</sup>adjusted residual,  $\chi^2$  *p* = 0.00071

<sup>b</sup>adjusted residual,  $\chi^2$  *p* = 0.00053

<sup>c</sup>N/A: not applicable (genotypic frequencies were not in HWE).

subjects carrying the CT genotype had a 1.90-fold increased risk of developing SLE (95% CI 1.11–3.28, *P* = 0.038) in comparison with those carrying the TT genotype. Likewise, a higher frequency of the C allele was observed in SLE African-derived patients compared to their controls (45% vs. 29%, *P* < 0.001), with the overall OR of 2.02 for the C allele (95% CI 1.42–2.86) in relation to the 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 the *FASL* IVS2nt-124A/G polymorphism, genotypic and allelic frequencies did not differ between European and African-derived cases and controls.

The studied polymorphisms in the *FASL* gene are in linkage disequilibrium. Thus, we performed haplotype analyses (Table 3). 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 the C/A haplotype carriers presented a 2.30-fold increased risk of developing SLE (95% CI 1.58–3.36, *P* < 0.001) in comparison with 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 4). *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 with their controls (19% vs. 62%, *P* < 0.001), with an OR of 0.12 in relation to individuals carrying the GG genotype (95% CI 0.02–0.51, *P* = 0.003). SLE subjects had a lower frequency of the A allele than controls (11% vs. 38%, *P* < 0.001; OR 0.21, 95% CI 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 5). 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.

**Table 3** Haplotype estimated frequencies of *FASL* -844 (*T* > *C*) and *FASL* *IVS2nt-124* (*A* > *G*) polymorphisms in SLE patients and controls, according to ethnic origin

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

<sup>a</sup>Adjusted residual: *P* = 2.0E-6.

<sup>b</sup>Adjusted residual: *P* = 1.7E-5.

**Table 4** 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

|                     | European-derived              |                               | African-derived   |                              |
|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|---|------------------------------|
|                     | Patients n = 246<br>n (freq.) | Controls n = 260<br>n (freq.) | Patients n = 83<br>n (freq.)                                | Controls n = 80<br>n (freq.) |
| BCL-2 -938 C/A      |                               |                               |   |                              |
| 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)                     |
|                     | <i>P</i> = N/A <sup>c</sup>   |                               | <i>P</i> = 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)                    |
|                     | <i>P</i> = 0.715              |                               | <i>P</i> = 0.060  |                              |
| <i>BAX</i> -248 G/A | n = 297                       | n = 212                       | n = 101   | n = 13                       |
| GG <sup>1</sup>     | 224 (0.75)                    | 153 (0.72)                    | 80 (0.79) <sup>a</sup>                                      | 4 (0.31) <sup>a</sup>        |
| GA <sup>2</sup>     | 67 (0.23)                     | 55 (0.26)                     | 19 (0.19) <sup>b</sup>                                      | 8 (0.62) <sup>b</sup>        |
| AA <sup>3</sup>     | 6 (0.02)                      | 4 (0.02)                      | 2 (0.02)  | 1 (0.07)                     |
|                     | <i>P</i> = 0.677              |                               | <i>P</i> = 0.0012   |                              |
|                     |                               |                               | <sup>1,2</sup> OR 0.12 (95% CI 0.02–0.51) <i>P</i> = 0.003  |                              |
|                     |                               |                               | <sup>1,3</sup> OR 0.10 (95% CI 0.00–7.36) <i>P</i> = 0.391  |                              |
|                     |                               |                               | <sup>2,3</sup> OR 0.84 (95% CI 0.04–55.82) <i>P</i> = 1.000 |                              |
| 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)                    |
|                     | <i>P</i> = 0.538              |                               | <i>P</i> < 0.001  |                              |
|                     |                               |                               | OR 0.21 (95% CI 0.08–0.58)                                  |                              |

<sup>a</sup>adjusted residual,  $\chi^2$  *p* = 0.00019

<sup>b</sup>adjusted residual,  $\chi^2$  *p* = 0.00065

<sup>c</sup>N/A: not applicable (genotypic frequencies were not in HWE).

#### Apoptosis of T cells in SLE patients and controls

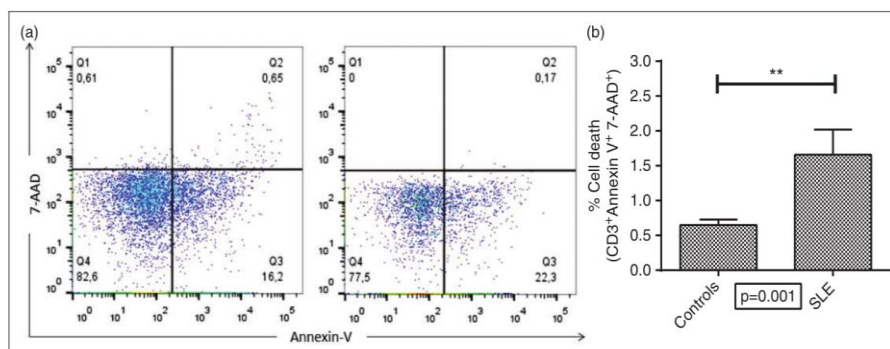
We measured the rate of apoptosis in lymphocytes from 47 SLE patients and 50 controls using AnnexinV binding as an indicator of phosphatidyl serine surface exposure in early apoptotic cells and 7-AAD DNA staining as a cell death indicator. Through the dot plots, we differentiated viable

cells (Annexin V<sup>-</sup> 7-AAD<sup>-</sup>) from early apoptotic cells (Annexin V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>-</sup>) and dead cells (Annexin V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+</sup>), see Figure 1. No difference was observed concerning the rate of early apoptotic cells (CD3<sup>+</sup> Annexin V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>-</sup>) between the groups. Early apoptotic cells represented 29.64 ± 0.04 in SLE patients as compared to

**Table 5** *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 <sup>a</sup> |                           |                               | European-derived SLE patients |       | P value <sup>a</sup> |
|----------------------|-------|--------------------------------|-------|----------------------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------|----------------------|
|                      |       | <b>APS</b>                     |       |                      |                           | <b>Thrombocytopenia</b>       |                               |       |                      |
| <i>FAS</i> -1377G/A  | Yes   | No                             |       |                      | <i>FASL</i> -844T/C       | Yes                           | No                            |       |                      |
| AG                   | 75%   | 16.5%                          | 0.003 |                      | CC                        | 43.1%                         | 28.2%                         | 0.026 |                      |
| GG                   | 25%   | 81.6%                          | 0.006 |                      | CT                        | 36.2%                         | 53.3%                         | 0.019 |                      |
|                      |       | <b>Serositis</b>               |       |                      |                           | <b>APS</b>                    |                               |       |                      |
|                      | Yes   | No                             |       |                      | <i>TT</i>                 | Yes                           | No                            |       |                      |
| AG                   | 5.6%  | 24.7%                          | 0.015 |                      |                           | 0%                            | 20.6%                         | 0.024 |                      |
| GG                   | 94.4% | 72.6%                          | 0.008 |                      |                           |                               |                               |       |                      |
|                      |       | <b>Thrombocytopenia</b>        |       |                      |                           | <b>Leukopenia/lymphopenia</b> |                               |       |                      |
| <i>AA</i>            | Yes   | No                             |       |                      | <i>FASL</i> IVS2nt-124A/G | Yes                           | No                            |       |                      |
|                      | 9.1%  | 0%                             | 0.005 |                      | GG                        | 3.4%                          | 0%                            | 0.037 |                      |
|                      |       |                                |       |                      | AG                        | 26.3%                         | 14.2%                         | 0.011 |                      |
|                      |       |                                |       |                      | AA                        | 70.4%                         | 85.8%                         | 0.002 |                      |
|                      |       | <b>Anti-DNA antibodies</b>     |       |                      |                           |                               |                               |       |                      |
| <i>FASL</i> -844T/C  | Yes   | No                             |       |                      |                           |                               |                               |       |                      |
| CC                   | 30.6% | 11.7%                          | 0.014 |                      |                           |                               |                               |       |                      |
| TT                   | 18.4% | 40%                            | 0.014 |                      |                           |                               |                               |       |                      |
|                      |       | <b>Immunological disorders</b> |       |                      |                           |                               |                               |       |                      |
|                      | Yes   | No                             |       |                      |                           |                               |                               |       |                      |
| CC                   | 26%   | 8.3%                           | 0.030 |                      |                           |                               |                               |       |                      |
|                      |       | <b>Anti-DNA antibodies</b>     |       |                      |                           |                               |                               |       |                      |
| <i>BCL-2</i> -938C/A | Yes   | No                             |       |                      |                           |                               |                               |       |                      |
| AA                   | 25.7% | 8.3%                           | 0.031 |                      |                           |                               |                               |       |                      |
| CC                   | 14.3% | 33.3%                          | 0.049 |                      |                           |                               |                               |       |                      |

<sup>a</sup>After Bonferroni's correction, all of the significant *P* values were lost.



**Figure 1** Early apoptosis and cell death of lymphocytes in systemic lupus erythematosus (SLE) patients and controls. Early apoptotic cells were identified using Annexin V binding as an indicator of phosphatidyl serine surface exposure. 7-AAD DNA staining was used as a cell death indicator. (a) Two representative flow cytometry dot plots indicating viable cells (lower left), early apoptotic cells (lower right), and dead cells (upper left). (b) SLE patients had an increased percentage of dead lymphocytes ( $CD3^+Annexin V^+ 7-AAD^+$ ) in comparison with the control group ( $1.66 \pm 0.36$  vs.  $0.65 \pm 0.08$ ;  $**P < 0.01$ ). No difference was found in relation to the rate of early apoptotic cells ( $CD3^+Annexin V^+ 7-AAD^-$ ) between the groups.

$31.75 \pm 1.58$  among controls ( $P = 0.351$ ). SLE patients presented a higher percentage of dead lymphocytes ( $CD3^+Annexin V^+ 7-AAD^+$ ) as compared to the control group ( $1.66 \pm 0.36$  vs.  $0.65 \pm 0.08$ ,  $P = 0.001$ ) (Figure 1(a and b)).

### Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to investigate the joint role of apoptotic-related *FAS*, *FASL*, *BCL-2* and *BAX* gene polymorphisms

in the susceptibility and pathogenesis of SLE. As the SLE incidence and the frequencies of apoptotic-related polymorphisms vary among different populations, our sample was classified according to the ethnic origin.<sup>2,38-42</sup> 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.<sup>43</sup>

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 the -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.<sup>16,44</sup> 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 to be 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 T cell receptor 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.<sup>41</sup> This same CC genotype (rs763110) was already associated with lupus in three different ethnic populations, i.e. Iranians, Taiwanese and African Americans.<sup>2,38,41</sup> Of note, the C allele frequencies observed in the literature were different among the distinct ethnic groups, and this situation will be discussed further 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 complex formation and to an overload of the body clearance system.<sup>38</sup>

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,<sup>13</sup> highlighting the importance of haplotypic studies.

Analyses of genetic polymorphisms involved in the intrinsic apoptosis pathway revealed that the genotypic frequencies of the *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 as 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.<sup>45,46</sup>

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 single nucleotide polymorphism 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.<sup>47</sup> The *BAX*-248G/A polymorphism has also been implicated in the risk of cancer, reduced protein expression and failure to achieve complete response to treatment.<sup>48,49</sup>

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 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 the present work the frequency of initial apoptosis and cell death in SLE was also evaluated. In lymphocytes, the phosphatidylserine is located on the inner leaflet of the plasma membrane. A typical feature during apoptosis is 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 a cell death indicator, we observed that SLE patients presented an increased frequency of death lymphocytes ( $P=0.001$ ), but whether these cells are late apoptotic or necrotic cells is still to be determined. Although our result could not be assigned to the presence of a specific genetic variant (data not shown), probably due to a relatively small sample size, it is in accordance with a previous study demonstrating that the percentage of necrotic cells was higher in SLE patients compared to controls. In contrast, this previous study also revealed increases of early apoptotic cells in patients with both active and inactive disease in relation to controls, a feature that was not confirmed by our work.<sup>5</sup> It is important to point out that the higher apoptosis of PBMCs in SLE is not a unanimous finding. Caricchio and Cohen<sup>50</sup> failed to demonstrate a difference in both spontaneous and UV-B-induced apoptosis between SLE patients and controls. The evaluation of apoptosis in SLE patients bearing specific genetic polymorphisms would be helpful in the definition of the role of such variants in lupus susceptibility and clinical progression.

In conclusion, our data corroborate the importance of cell death and apoptosis in SLE and 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 a lower frequency of the *BAX* -248A allele, related to lower protein expression, which could represent a protective factor against the disease.

#### Acknowledgements

The authors would like to thank colleagues from the immunogenetics laboratory of Universidade Federal do Rio Grande do Sul for all their technical support, especially Jacqueline Maria Valverde Villegas, Francis Maria Bão Zambra and Thais Lopes. They are also grateful for the clinical support given by the medical professionals from the division of rheumatology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

#### Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

#### Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: 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 JC, Lioussis SN, Kis-Toth K, *et al.* Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med* 2010; 16(2): 47–57.
- 2 Moudi B, Salimi S, Farajian Mashhadi F, *et al.* Association of *FAS* and *FAS* ligand genes polymorphism and risk of systemic lupus erythematosus. *Scientific World Journal* 2013; 2013: 176741.
- 3 Rekvig OP, Van der Vlag J. The pathogenesis and diagnosis of systemic lupus erythematosus: still not resolved. *Semin Immunopathol* 2014; 36(3): 301–311.
- 4 Molokhia M, McKeigue P. Systemic lupus erythematosus: genes versus environment in high risk populations. *Lupus* 2006; 15(11): 827–832.
- 5 Xue C, Lan-Lan W, Bei C, *et al.* Abnormal Fas/FasL and caspase-3-mediated apoptotic signaling pathways of T lymphocyte subset in patients with systemic lupus erythematosus. *Cellular Immunol* 2006; 239(2): 121–128.
- 6 Kaplan MJ. Apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2004; 112(3): 210–218.
- 7 Pieterse E, van der Vlag J. Breaking immunological tolerance in systemic lupus erythematosus. *Front Immunol* 2014; 5: 164.
- 8 Monticeli OA, Mucenic T, Xavier RM, *et al.* The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 2008; 27(4): 413–419.
- 9 Zhuo W, Zhang Y, Xiang Z, *et al.* Polymorphisms of TP53 codon 72 with breast carcinoma risk: evidence from 12,226 cases and 10,782 controls. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 115.
- 10 Chen K, Hu Z, Wang LE, *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): 2008–2012.
- 11 Nagy G, Koncz A, Perl A. T- and B-cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Crit Rev Immunol* 2005; 25(2): 123–140.
- 12 Feng Y. [Studies on Fas ligand expression in patients with systemic lupus erythematosus]. *Hokkaido Igaku Zasshi* 1997; 72(4): 443–455.
- 13 Nolsoe RL, Kelly JA, Pociot F, *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): 699–706.
- 14 Nagata S, Suda T. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunology Today* 1995; 16(1): 39–43.
- 15 Lee YH, Kim YR, Ji JD, *et al.* Fas promoter -670 polymorphism is associated with development of anti-RNP antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2001; 28(9): 2008–2011.
- 16 Mohammadzadeh A, Pourfathollah AA, Tahoori MT, *et al.* Evaluation of apoptosis-related gene Fas (CD95) and FasL (CD178) polymorphisms in Iranian rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int* 2011; 32(9): 2833–2836.
- 17 Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 2003; 39(11): 615–647.
- 18 Brown R. The bcl-2 family of proteins. *Br Med Bull* 1997; 53(3): 466–477.
- 19 Liphauts BL, Kiss MH. The role of apoptosis proteins and complement components in the etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clinics (Sao Paulo)* 2010; 65(3): 327–333.

**Anexo 3.** Resultado das frequências genotípicas e alélicas de polimorfismos em *NKG2* em 362 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e 425 controles saudáveis. Artigo científico em preparação “*Influence of polymorphic variants in NKG2 genes and their role in systemic lupus erythematosus susceptibility and clinical progression*”.

**Table 1. NKG2 polymorphisms and LES susceptibility.**

|                           | LES group<br>n=364 | Control group<br>n=415 |
|---------------------------|--------------------|------------------------|
| rs1049174                 |                    |                        |
| <i>NKG2D</i> C>G Genotype |                    |                        |
| CC                        | 142 (41.8%)        | 182 (44.2%)            |
| CG                        | 148 (43.5%)        | 179 (43.4%)            |
| GG                        | 50 (14.7%)         | 51 (12.4%)             |
| <i>NKG2D</i> C>G Allele   |                    |                        |
| C                         | 432 (63.5%)        | 543 (65.9%)            |
| G                         | 248 (36.5%)        | 281 (34.1%)            |
| rs2255336                 |                    |                        |
| <i>NKG2D</i> G>A Genotype |                    |                        |
| GG                        | 221 (61.0%)        | 236 (56.9%)            |
| GA                        | 123 (34.0%)        | 150 (36.1%)            |
| AA                        | 18 (5.0%)          | 29 (7.0%)              |
| <i>NKG2D</i> G>A Allele   |                    |                        |
| G                         | 565 (78.0%)        | 622 (74.9%)            |
| A                         | 159 (22.0%)        | 208 (25.1%)            |
| rs2734440                 |                    |                        |
| <i>NKGA</i> A>G Genotype  |                    |                        |
| AA                        | 138 (37.9%)        | 127 (31.0%)            |
| AG                        | 167 (45.9%)        | 186 (45.4%)            |
| GG                        | 59 (16.2%)         | 97 (23.7%)             |
| <i>NKG2A</i> A>G Allele   |                    |                        |
| A                         | 443 (60.9%)        | 340 (53.7%)            |
| G                         | 285 (39.1%)        | 194 (46.3%)            |

Data represented as n (%).

## **Anexo 4.** Artigo científico

### *Review Article*

## **New Insights about Treg and Th17 Cells in HIV Infection and Disease Progression**

**Jacqueline Maria Valverde-Villegas, Maria Cristina Cotta Matte, Rúbia Marília de Medeiros, and José Artur Bogo Chies**

*Immunogenetics Laboratory, Genetics Department, Genetics and Molecular Biology Post-Graduate Program, Institute of Biosciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 9500, Prédio 43323, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil*

Correspondence should be addressed to José Artur Bogo Chies; jabchies@terra.com.br

Received 15 May 2015; Accepted 26 July 2015

Academic Editor: Andrew D. Badley

Copyright © 2015 Jacqueline Maria Valverde-Villegas et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Treg and Th17 cell subsets are characterized by the expression of specific transcriptional factors and chemokine receptor as well as by secretion of specific cytokine and chemokines. These subsets are important to the differentiation, expansion, homing capacity, and recruitment of several different immune cell populations to the site of infection. Whereas Treg cells maintain self-tolerance and control the activation and expansion of autoreactive CD4<sup>+</sup> T effector cells through an anti-inflammatory response, Th17 cells, in an exacerbated unregulated proinflammatory response, can promote autoimmunity. Despite such apparently opposite functions, Th17 and Treg cells share common characteristics, and their differentiation pathways are interconnected. Recent studies have revealed quite intricate relations between Treg and Th17 cells in HIV infection and progression to AIDS. Considering Treg cells, different subsets were already investigated in the context of HIV infection, indicating a fluctuation in the total number and frequency throughout the disease course. This review focuses on the recent findings regarding the role of regulatory T and Th17 cells in the context of HIV infection, highlighting the importance of the balance between these two subsets on disease progression.

### **Authors' Contribution**

Jacqueline Maria Valverde-Villegas, Maria Cristina Cotta Matte, and Rúbia Marília de Medeiros contributed equally to this paper. José Artur Bogo Chies reviewed the final paper.

## Protective Role of *BST2* Polymorphisms in Mother-to-Child Transmission of HIV-1 and Adult AIDS Progression

Anselmo J. Kamada, MSc,\* Anna M. Bianco, PhD,† Luisa Zupin, MSc,‡ Martina Girardelli, PhD,†  
 Maria C. C. Matte, MSc,§ Rúbia Marília de Medeiros, MSc,‡ Sabrina Esteves de Matos Almeida, PhD,§  
 Marineide M. Rocha, MD,|| Ludovica Segat, PhD,† José A. B. Chies, PhD,‡ Louise Kuhn, PhD,¶  
 and Sergio Crovella, PhD†

**Abstract:** Bone marrow stromal cell antigen-2 (BST-2)/Tetherin is a restriction factor that prevents Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) release from infected cells and mediates pro-inflammatory cytokine production. This study investigated the risk conferred by single nucleotide polymorphisms (rs919266, rs919267, and rs9576) at BST-2 coding gene (*BST2*) in HIV-1 mother-to-child transmission and in disease progression. Initially, 101 HIV-1+ pregnant women and 331 neonates exposed to HIV-1 from Zambia were enrolled. Additional *BST2* single nucleotide polymorphism analyses were performed in 2 cohorts with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) progression: an adult Brazilian cohort (37 rapid, 30 chronic and 21 long-term non-progressors) and an Italian pediatric cohort (21 rapid and 67 slow progressors). The rs9576A allele was nominally associated with protection during breastfeeding ( $P = 0.019$ ) and individuals carrying rs919266 GA showed slower progression to AIDS ( $P = 0.033$ ). Despite the influence of rs919266 and rs9576 on *BST2* expression being still undetermined, a preventive role by *BST2* polymorphisms was found during HIV-1 infection.

**Key Words:** HIV-1, BST-2, SNPs, mother-to-child transmission of HIV-1, AIDS progression

(*J Acquir Immune Defic Syndr* 2016;72:237–241)

Received for publication November 19, 2015; accepted February 1, 2016. From the \*Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; †Institute for Maternal and Child Health, Istituto Di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Burlo Garofolo," Trieste, Italy; ‡Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; §Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre, Brazil; ||Infectious Diseases Section, Hospital Nossa Senhora da Conceição, Porto Alegre, Brazil; and \*Department of Epidemiology, Columbia University, New York, NY. Supported by CAPES/CNPq (Casadinho 06/2011), IRCCS "Burlo Garofolo" (RC13/12) and National Institute of Health (HD57617).

The authors have no funding or conflicts of interest to disclose. Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site ([www.jaids.com](http://www.jaids.com)).

Correspondence to: Anselmo J. Kamada, MSc, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, CEP: 50670-901, Brazil (e-mail: [anselmojiro@gmail.com](mailto:anselmojiro@gmail.com)).

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

### INTRODUCTION

Rate of mother-to-child transmission (MTCT) of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) ranges from 5% to 10% during pregnancy, 20% to 30% during delivery, and 10% to 20% through breastfeeding in the absence of treatment, whereas it is reduced to less than 2% with antiretroviral therapy during gestation.<sup>1</sup> Since the majority of newborns from infected mothers do not become infected, several host factors have been investigated by clinical follow-up of untreated pregnant women, mainly in countries with limited antiretroviral regimen coverage. Despite obstetric, nutritional, socio-demographic, and viral factors being involved in natural prevention to MTCT,<sup>2</sup> innate immunity have been recently highlighted as a modulator of early antiviral response at the fetal–maternal interface.<sup>3</sup>

“Bone marrow stromal cell antigen-2” (BST-2/Tetherin) transmembrane protein prevents HIV-1 particles release by virion retention at membranes of infected cells.<sup>4</sup> HIV-1 tethering leads to BST-2 cytoplasmic tail phosphorylation, which triggers proinflammatory cytokines production mediated by NF- $\kappa$ B signaling,<sup>5</sup> and may also facilitate HIV-1 endocytosis followed by type I interferon (IFN) expression.<sup>6</sup> Although BST-2 constitutive expression was found at various immune cells [macrophages, monocytes, plasmacytoid dendritic cells (pDCs), B and T-lymphocytes],<sup>5,7,8</sup> tissues (liver, lung, cord blood and decidua),<sup>9–11</sup> and secretions (colostrum and semen),<sup>11,12</sup> the influence of BST-2 on early HIV-1 prevention and pathogenesis is still underestimated.

Recent studies investigated the role of BST-2 genetic background in differential response to HIV-1 infection. An insertion/deletion polymorphism at the promoter region (rs3217318) and a single nucleotide polymorphism (SNP, rs10415893) of *BST2* gene (located at 19p13.1) were associated with lower transcriptional levels of *BST2* and faster disease progression in a Spanish cohort,<sup>13</sup> whereas rs113189798 SNP was described as a risk factor to HIV-1 acquisition in North American seroprevalent drug users.<sup>14</sup>

Thus, this study evaluated the role of *BST2* SNPs in susceptibility to MTCT of HIV-1 in a cohort of 331 infants and 101 infected mothers. Additional analyses were performed in 88 pediatric patients and 88 adults to investigate the influence of *BST2* SNPs on HIV-1-associated disease progression.