

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

***ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DA LECTINA
LIGADORA DA MANOSE E HÁBITO TABAGISTA SOBRE OS
ÍNDICES DE ATIVIDADE, CRONICIDADE E DANO
DE PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO***

Guilherme Gischkow Rucatti

Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas
Para obtenção do título de Mestre
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Pós-Graduação em Ciências Médicas
Faculdade de Medicina

Orientador: Ricardo Machado Xavier

Dissertação de Mestrado
Porto Alegre, 2011

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

***ESTUDO DA INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DA LECTINA
LIGADORA DA MANOSE E HÁBITO TABAGISTA SOBRE OS
ÍNDICES DE ATIVIDADE, CRONICIDADE E DANO
DE PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO***

Guilherme Gischkow Rucatti

Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas
Para obtenção do título de Mestre
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Pós-Graduação em Ciências Médicas
Faculdade de Medicina

Orientador: Ricardo Machado Xavier

Dissertação de Mestrado
Porto Alegre, 2011

AGRADECIMENTOS

Ao longo destes meus dois anos de pós-graduação em Ciências Médicas, tive a oportunidade de conhecer muitas pessoas, visitar lugares, exercer habilidades específicas e principalmente pesquisar, adquirir e gerar conhecimentos que possam contribuir de alguma forma para a ciência.

Durante este período como pesquisador, busquei encontrar diferenças e/ou semelhança dentre variáveis em diversos trabalhos. Estas diferenças ou semelhanças, por sua vez, são descritas pelo que é chamado “*valor-p*”. Este valor estatístico, após ser fixado, indica se o que foi encontrado é significativamente diferente ou igual.

A meu ver, o principal *valor-p* observado neste tempo de mestrado não tem a ver com os achados da pesquisa e sim com o pesquisador. Como formação, este biênio de estudos me proporcionou um nível de aprimoramento acadêmico e técnico que não imaginei atingir. Contudo, o que realmente fez estes dois anos serem significativamente diferentes, foram as pessoas com que tive a oportunidade de trabalhar, conviver, crescer, fazer ciência e principalmente viver.

As estas pessoas um muito obrigado! Sem vocês estes dois anos não teriam um *valor-p* tão significativo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVEATURAS	2
RESUMO.....	4
ABSTRACT	6
2 REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 O TABAGISMO E O SISTEMA IMUNE.....	10
2.1.1 O Tabagismo e o Lupus Eritematoso Sistêmico	15
2.3 EPIDEMIOLOGIA DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.....	22
2.4 ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.....	22
2.5 O SISTEMA COMPLEMENTO.....	26
2.5.1 A Letina Ligadora da Manose e o Lupus Eritematoso Sistêmico	27
3 OBJETIVOS	33
4 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA	34
5 ARTIGO CIÊNTÍFICO.....	41
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
7 ANEXOS	61
7.1 ANEXO I - CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	61
7.2 ANEXO II - PROTOCOLO DE PESQUISA.....	63
7.3 ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO.....	64

LISTA DE ABREVEATURAS

ACR	American College of Rheumatology
APS	Síndrome antifosfolípideo
AR	Artrite Reumatóide
B	Linfócitos B
C	Componente do sistema complemento
CAT	Categoria
CD	Antígeno celular
CTL4	Antígeno 4 de Linfócitos T-citotóxicos
DC	Células Dendríticas
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DRC	Domínio de Reconhecimento de Carboidratos
dsDNA	DNA de fita dupla
FcyRs	Receptores do Fcy
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IC	Intervalo de Confiança
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF	Interferon
LE	Lúpus Eritematoso
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LPS	Lipopolisacarídeos
MA	Maços/ano
MASP	MBL-associated Serine Protease
MBL	Mannose-binding Lectin
MGL2	Gene produtor da MBL
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
nAChRs	Receptores Nicotínicos da Acetilcolina
NK	Células Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
NOD	Non-obese diabetic

NPM	Neutr3falo Polimorfonuclearse
OR	Odds Ration
PCR-RFLP	Polimerase Chain Reaction with Restriction Fragment Length
PCR-SSP	Polimerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers
PTPN22	Prote3na tirosina fosfatase N22
ROS	Radicais livres de oxig3nio
RR	Risco Relativo
SC	Sistema Complemento
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SLICC	Systemic Lupus International Collaborative Clinics/ACR
T	Linf3citos T
TLR	Toll like Receptor
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UV	Luz Ultravioleta
VDRL	Venereal Disease Research Laboratory test

RESUMO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença auto-imune caracterizada pela produção de múltiplos auto-anticorpos, com componentes celulares nucleares como principal alvo. De etiologia desconhecida, envolve fatores genéticos, imunológicos, hormonais e ambientais. A deficiência na lectina ligadora da manose (MBL), um dos componentes do sistema de complemento, pode produzir uma apresentação anormal de antígenos para o sistema imunológico. Os polimorfismos genéticos na região promotora e codificante do gene MBL2 estão fortemente correlacionados com os níveis séricos da proteína MBL, tendo um possível impacto no mecanismo de tolerância imunológica. A influência do tabagismo ainda não foi avaliada em pacientes que apresentam estas variações alélicas. Nosso objetivo foi investigar o papel dos haplótipos associados à produção de MBL e tabagista sobre os índices de atividade, cronicidade e dano em pacientes com LES. Investigamos a frequência haplótipica da MBL em 327 pacientes com LES, classificados em Euro e Afro-descendentes. O hábito tabagista, dados clínicos e laboratoriais foram retirados dos prontuários e protocolos de pesquisa. A genotipagem do promotor e das variantes do exon 1 da MBL2 foram feitas por PCR-SSP e PCR-RFLP, respectivamente. Os índices SLICC e SLEDAI foram analisados comparando tabagismo, maços/ano (MA) e haplótipos através do teste Kruskal-Wallis e qui-quadrado com Bonferroni para as outras análises. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do HCPA. Quando comparados fumantes e não-fumantes, não encontramos associação entre SLEDAI e SLICC com tabagismo, MA e os haplótipos da MBL. Em uma subanálise, manifestações como serosite ($p = 0.025$), pericardite ($p = 0.015$), convulsões ($p = 0.011$) e presença de anticorpos anti-Sm ($p = 0.016$) apresentaram uma maior frequência em não-fumantes. Entre fumantes, foi observado uma associação significativa entre alterações imunológicas ($p = 0.032$) e anti-RNP ($p = 0,013$) em pacientes que fumam de 4-24.7 MA, em comparação com quem fuma menos de 4 ou mais de 24.7 MA. Quando estratificados por etnia e os haplótipos da MBL, Euro-descendentes com haplótipos para deficiência de MBL apresentaram uma maior frequência de anticoagulante lúpico em fumantes ($p = 0.016$) e pleurite ($p = 0.001$) entre os que nunca fumaram. Nos haplótipos associados à baixa MBL, encontramos uma associação positiva entre pericardite em não-fumantes ($p = 0.027$).

Entre os haplótipos para alta MBL, vimos uma menor frequência de distúrbios neurológicos ($p = 0.05$) e imunológicos ($p = 0.027$) e presença de anticorpos anti-Sm ($p = 0.035$) em não-fumantes. Em relação aos Afro-descendentes com haplótipos para baixa MBL, observou-se uma associação significativa entre o anti-RNP ($p = 0.017$) e não-fumantes. Aqueles indivíduos com haplótipo para alta MBL tiveram uma pequena associação entre o VDRL em não-fumantes ($p = 0.048$). Contudo, quando ajustado o p-valor para a correção de Bonferroni, todas essas associações perderam significância. Os resultados não apresentaram evidências de que o tabagismo possa atuar como um modulador dos índices de atividade, cronicidade e dano em pacientes com LES relacionado aos haplótipos da MBL.

Palavras-chave: Lectina ligadora da manose; lupus eritematoso sistêmico; polimorfismos, tabagismo, sistema do complemento.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by multiple autoantibody production, with cellular nuclear components as the most notable targets. With an unknown etiology, it involves genetic, immunological, hormonal and environmental factors. Deficiencies in the mannose-binding lectin (MBL), a component of the complement system, can produce an abnormal presentation of antigens to the immune system. Genetic polymorphisms in the promoter and coding regions of the *MBL2* gene are strongly correlated to serum levels of the MBL protein, with possible impact in the immunological tolerance mechanism. The influence of smoking has not been evaluated in patients who present these allelic variants. Our aim was to investigate the role of MBL haplotypes (divided as deficient, low and high serum level-associated haplotypes) and smoking habit on disease activity and damage indexes in SLE patients. We investigated the frequencies of haplotype variants in 327 European and African-descendants SLE patients. Smoking habits, clinical and laboratory data were revised from clinical charts and genotyping of the promoter and exon 1 variants of *MBL2* were performed by PCR-SSP and PCR-RFLP, respectively. SLICC and SLEDAI score were analyzed comparing the haplotype, smoking habits and pack-years (PY) of smoking using Kruskal-Wallis test for quantitative variables and chi-square test with Bonferroni for other analysis. The study was approved by the local ethical committee. When comparing ever smokers vs. never smokers, we found a lack of association between SLICC and SLEDAI among smoking habit, PY and MBL haplotypes. Further subanalysis on SLE manifestations showed a higher frequency of serositis ($p=0.025$), pericarditis ($p=0.015$), convulsion ($p=0.011$) and presence of anti-Sm ($p=0.016$) on never smokers. Among ever smokers, a significant association was observed between immunologic disorders ($p=0.032$) and anti-RNP ($p=0.013$) in patients who smoke 4 – 24.7 PY, compared with less than 4 or more than 24.7 PY. When stratified by ethnicity and MBL haplotypes, European-descendants with deficient MBL haplotype showed a higher frequency of lupus anticoagulant in smokers ($p=0.001$) and pleuritis ($p=0.016$) among never smokers. On low MBL haplotype, we found a positive association between pericarditis and never smokers ($p=0.027$). Among high MBL haplotype we identified a smaller frequency of neurologic ($p=0.05$) and

immunologic disorders ($p= 0.027$) and presence of anti-Sm ($p= 0.035$) in never smokers. In relation to African-descendants with low MBL haplotype, a significant association between anti-RNP ($p=0.017$) and never smokers was observed. Those with high MBL haplotype had small association between false positive VDRL and never smokers ($p=0.048$). However, by adjusting the p -value for Bonferroni correction, all these associations lost significance. Our findings presented no evidence that smoking may act as a modulator of disease activity and damage indexes on SLE patients associated to serum MBL haplotypes.

Key-words: Mannose-Binding Lectin, Systemic Lupus Erythematosus, Polymorphism, Smoking, Complement System.

1 INTRODUÇÃO

O sistema imune, um complexo e eficiente sistema de defesa, nos protege contra agentes externos e internos danosos, mantendo a nossa homeostasia. A exposição à fumaça do cigarro claramente traz um impacto sobre o sistema imune, comprometendo a capacidade do indivíduo de montar uma resposta de defesa efetiva ou até gerando uma reação exacerbada. Enquanto o consumo de cigarro tem sido associado ao desenvolvimento de diferentes doenças reumáticas e inflamatórias, o lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma das poucas relatadas e reproduzidas através de consistentes dados epidemiológicos. O LES é uma doença inflamatória crônica auto-imune com envolvimento de múltiplos órgãos e sistemas, sendo caracterizada pela produção de anticorpos autoreativos e formação de imunocomplexos. Há evidências de diversos fatores na participação no desencadeamento da doença. A associação entre o tabagismo e o LES já é um assunto amplamente discutido em diversos estudos caso-controle. No entanto, a maioria destes trabalhos baseia-se apenas em dados epidemiológicos, não avaliando potenciais mecanismos de ação e a interação desse fator ambiental com os fatores genéticos que contribuem à suscetibilidade do LES.

Alguns estudos têm evidenciado um possível papel da lectina ligadora da manose (MBL – *mannose-binding lectin*) na fisiopatogênese do LES. Pertencente à superfamília das colectinas, ela possui estrutura molecular semelhante ao componente C1q do sistema complemento, sendo um dos fatores de ativação da sua cascata. Juntas, o complemento e a MBL estão associadas à destruição de microorganismos, depuração de material celular apoptótico e imuno complexos. Vários polimorfismos genéticos que determinam baixas concentrações séricas da MBL têm sido associados com predisposição ao LES, além de mostrarem relação com manifestações clínicas e laboratoriais típicas desta doença [1].

A fumaça do cigarro pode levar a indução de apoptose e acúmulo de material celular nos diversos tecidos do aparelho respiratório. Este aumento de exposição à autoantígenos intracelulares pode ser um dos fatores que leva à ruptura dos mecanismos de tolerância imunológica, gerando a produção de anticorpos autoreativos. Dentro deste mesmo contexto, o hábito do tabagismo também pode imuno modular as quantidades circulantes de MBL, como descrito [2], e interferir na

depuração de imunocomplexos. No LES, no entanto, são poucos os estudos que relacionam a interação entre gene-tabagismo e a susceptibilidade à doença. Este trabalho objetiva avaliar a relação entre os haplótipos associados à produção de MBL em pacientes diagnosticados com LES, buscando possíveis associações genético-ambientais entre os índices de atividade, dano e cronicidade da doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O TABAGISMO E O SISTEMA IMUNE

A queima do tabaco do cigarro produz mais de 6.000 diferentes componentes, sem contar os seus metabólitos [3]. Além da nicotina, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, glicoproteínas e metais também são encontrados na fumaça e descritos por suas características antigênicas, mutagênicas, carcinogênicas, citotóxicas e imunomoduladoras. O uso do tabaco afeta múltiplos órgãos e sistemas resultando em inúmeras doenças induzidas por este hábito. Os riscos para a saúde causados pelo tabagismo são bem conhecidos, especialmente aqueles relacionados ao trato respiratório e ao sistema cardiovascular. Ainda sim, o tabagismo é um dos maiores fatores ambientais associados com alterações na saúde e mudanças funcionais do sistema imunológico [2, 4]. Tanto a exposição direta como a indireta a estes produtos químicos, influencia o sistema imunológico de diversas maneiras [3, 5], e cada vez mais novos mecanismos estão sendo descobertos ligando este hábito às doenças auto-imunes.

Ao se acender um cigarro, a chama encontrada na ponta do cigarro aquece todo o ar que passa por dentro dele e à medida que este ar superaquecido cruza pelo tabaco, gera a evaporação da nicotina e outros tantos elementos. Ao passo que o ar vai se resfriando, alguns destes componentes passam a se condensar em partículas do tamanho de micra. A inalação destes aerossóis de nicotina e estas micro-partículas geram uma eficiente deposição alveolar e conseqüentemente uma rápida absorção para o sangue sistêmico [6]. O contato disseminado com estes elementos pode promover o surgimento e alteração de autoantígenos, mutações de genes imunoregulatórios e até mesmo o aumento na suscetibilidade de autoimunidade por infecções [7].

O consumo do cigarro está associado tanto com liberação e inibição de mediadores pró-inflamatórios como anti-inflamatórios. A fumaça do cigarro induz a liberação do fator de necrose tumoral α (TNF- α) e seus receptores, interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8 e fator de estimulação de colônia de macrófagos (GM-CSF) [8, 9]. Por outro lado, o tabagismo também tem sido associado com a diminuição de algumas citocinas. Hagiwara *et al.* mostram uma diminuição na produção de IL-6 através da

ativação dos receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*) (TLR)-2 e 9, redução de IL-10 através da ativação do TLR-2 e dos níveis de IL-1 β , IL-2, TNF- α e interferon γ (IFN- γ) por células mononucleares [10]. A queima do tabaco de cigarro também é descrita capaz de modular tanto a resposta imune humoral [11, 12], como aquelas mediadas por células [13, 14].

Na resposta humoral, os macrófagos são a principal população de células presentes nos pulmões e servem como a primeira linha de defesa celular contra patógenos e poluentes. Esta característica deve-se às suas propriedades fagocíticas e sua função apresentadora de antígenos. A exposição crônica à fumaça provoca um influxo de macrófagos alveolares no lúmen das vias aéreas [15]. Micropartículas encontradas na fumaça do cigarro (principal a argilosa) são visíveis em um microscópio de luz no citoplasma de macrófagos alveolares, mesmo após um curto período de uso do tabaco, podendo persistir até 2 anos após a cessação do tabagismo [12]. Em geral, os macrófagos obtidos de fumantes de tabaco são menos maduros, possuem expressão elevada de CD14 (marcador de monócitos), citoplasma condensado e hiperdenso, e têm um maior efeito inibitório sobre a proliferação de linfócitos e células *natural killer* (NK) do que macrófagos oriundos de não fumantes [16].

Quanto aos neutrófilos polimorfonucleares (NPM), a resposta inflamatória sistêmica, desencadeada pela exposição à fumaça do cigarro, é caracterizada pela estimulação do sistema hematopoiético, especialmente da medula óssea, o que resulta na liberação de leucócitos e plaquetas na circulação. Este evento está atribuído ao aumento do número relativo de NPM na circulação e redução de sua funcionalidade [17]. Tell *et al.* mostram que esta abundância de NPM nas vias respiratórias de fumantes aumenta a atividade de enzimas proteolíticas, como a elastase neutrofílica, a catepsina G e protease-3, que por sua vez, também têm efeito destrutivo sobre as células ciliadas e matriz extracelular [18]. Por outro lado, a nicotina mostrou-se capaz de inibir a formação de radicais livres de oxigênio em NPM e reduzir a migração e quimiotaxia dos NPM em comparação a não-fumantes. Deste modo, é possível que a nicotina também tenha a capacidade de suprimir ações inflamatórias mediadas por estes neutrófilos [19].

As células dendríticas (DC), responsáveis em iniciar a resposta imune aos primeiros sinais de “perigo”, identificam patógenos, citocinas inflamatórias e fatores derivados de tecidos [20]. Ao serem ativadas, elas promovem a ativação e

diferenciação de células T através de dose-resposta a antígenos e principalmente pela presença de IL-12. Esta ativação gera células T de memória efetoras, essenciais para imunidade de longa duração. A exposição à fumaça do cigarro mostra-se capaz de diminuir a capacidade de sinalização celular destas células, reduzindo atividades endocíticas e fagocíticas, queda na capacidade estimulatória de células apresentadoras de antígenos T-dependentes e redução na expressão de moléculas co-estimulatórias em DC maduras [21]. Em estudo publicado em 2003, os autores observaram um comprometimento na capacidade funcional e de diferenciação de monócitos derivados de DC, na presença da nicotina [22]. Relataram uma alta produção de IL-10 e uma falha na produção de IL-12 entre células DC expostas à nicotina comparada as controles [23]. Os autores discutem que grande parte deste efeito imunossupressor da nicotina sobre o sistema imune, deve-se, em parte, ao seu efeito sobre a atividade biológica das DC em relação às células Th1 efetoras.

Alguns trabalhos ainda apontam uma relação entre a IL-12 a autoimunidade. Sendo uma interleucina pró-inflamatória, a IL-12 é produzida principalmente por macrófago e células dendríticas. Ela aumenta a atividade citotóxica das células NK e desencadeia a liberação imediata de INF- γ através destas células e células T maduras. Além disso, a IL-12 leva a proliferação de células T e a produção de outras citocinas como TNF- α , GM-CSF e IL-2. Em modelos de camundongos modelo a deficiência de IL-12 ou que passaram por um *knock-out* do gene da IL-12, observou-se uma proteção no desenvolvimento de doenças autoimunes como colite, artrite induzida por colágeno, encefalomielite, uveíte autoimune e diabetes [24-26]. Alguns grupos também observaram o envolvimento de IL-12 na patogênese da nefrite lúpica, representada por camundongos MRLlpr/lpr e NZB. Em ambos os trabalhos, a IL-12 mostrou-se aumentada em rins nefríticos. Os autores discutem que o papel desta citocina na patogênese da nefrite, seria devido ao aumento nos níveis de IFN- γ , óxido nítrico (NO) e produção de anticorpos relacionados às células Th1 [24, 25]. Acredita-se que a relação entre a IL-12 e auto-imunidade, deve-se ao seu papel fundamental na indução de resposta imune do tipo Th1, já que grande parte das células Th1 efetoras são responsáveis por doenças inflamatórias de origem autoimune, mediadas por células [26].

Em relação aos linfócitos T, glicoproteínas ricas em polifenóis isoladas a partir de folhas do tabaco e presentes na fumaça do cigarro demonstram capacidade de

estimulação da proliferação de linfócitos T periféricos [27] elevando o número total de células circulantes [28]. Já a diferenciação destes linfócitos T é questão controversa. Alguns pesquisadores relataram uma diminuição de células CD4 (T-auxiliadoras) acompanhada por comprometimento de função e aumento de células CD8 (T - supressoras), com uma subsequente diminuição no balanço CD4/CD8 em fumantes pesados (mais de 50 maços/ano(MA)) [14]. Em fumantes leves, com menos de 50 MA, foi observado um aumento na contagem de leucócitos, com uma elevação seletiva para células CD4, resultando em um aumento significativo da relação CD4/CD8 [29]. A partir de dois a quatro anos após a suspensão do tabagismo, o aumento de CD4 desapareceu [30]. Estudos de lavagem broncoalveolar mostram uma marcada diminuição no percentual de células CD4 e um aumento de células CD8 em tabagistas moderados (14 MA). Os autores sugerem que as subpopulações de linfócitos-T circulantes, presentes nos pulmões, reproduzem as mudanças alveolares causadas pela fumaça [31].

Os efeitos inibitórios do cigarro são atribuídos principalmente à nicotina, às hidroquinonas (compostos fenólicos do alcatrão) e ao monóxido de carbono presente na fumaça. A nicotina é um dos mais bem estudados constituintes do cigarro. Embora esta substância por si só não seja associada diretamente ao câncer e doenças em geral, existe um debate de até onde ela não desregula processos biológicos como a angiogênese, apoptose e a imunidade celular, acarretando em doenças [32]. Seus efeitos inibitórios são atribuídos a sua função biológica através dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) presentes em neurônios mas também em tecidos não-nervosos como músculos e células do sistema imune, como macrófagos, células T e células B.

Constituído por sub-unidades de forma pentamérica, os nAChRs possuem uma grande variedade de sub-tipos que ativam diferentes vias de sinalização intracelular. Alguns trabalhos relatam que o cigarro debilita o sistema imunológico através da exaustão das vias de sinalização das quais os receptores de antígenos dos linfócitos dependem. Isto acontece pela ação direta da ligação da nicotina sobre os receptores nAChRs presentes nos linfócitos. Esta ligação resulta em uma constante estimulação das cascatas de sinalização e, conseqüentemente, a liberação de Ca^{2+} intracelular mediado por trifosfato de inositol (IP_3), essencial para o sinal de transdução [33]. Os receptores de células T e B dependem das mesmas vias de sinalização.

Recentemente, estudos demonstraram que linfócitos de animais expostos a nicotina e a fumaça do cigarro, tem uma redução nas células secretoras de antígenos, incapacidade de montar um fluxo de Ca^{2+} em resposta à ligação de antígenos e uma redução na capacidade proliferativa [33, 34]. A ação cruzada entre estas vias de sinalização pode estar gerando uma anergia entre os linfócitos, prejudicando o reconhecimento de antígenos e afetando a resposta imune. Em trabalho publicado em 2009, mostrou-se que a ativação dos receptores nAChRs pela fumaça do cigarro, gera a redução na produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, suprimindo a ativação de células Th1 e Th17, mas não de Th2 [34].

Em um estudo apresentado por Rubin *et al.*, 2005, comparando humanos e ratos com LES e o efeito de exposição à fumaça de cigarro, foi demonstrada a supressão no desenvolvimento de auto-anticorpos do tipo IgG anti-cromatina e anti-DNA que, quando descontinuada, repercutiu em um aumento significativo dos mesmos. No mesmo trabalho, em humanos foi observada uma maior frequência de poliserosites e manifestações neuropsiquiátricas em indivíduos que fumavam e um aumento de IgM e não IgG. Curiosamente, aqueles pacientes que pararam de fumar há mais de nove anos, tinham significativamente uma concentração maior de IgG que o grupo controle. Os autores discutem que tais alterações podem estar ligadas à capacidade de imunossupressão da nicotina que, quando descontinuada, eliminaria o efeito de supressão elevando assim os níveis de auto-anticorpos [7]. No mesmo trabalho, revisam que o fumo ainda suprime outras doenças inflamatórias, podendo funcionar como um fator de proteção em colites ulcerativas e inflamações cutâneas, através de *patches* transdermais contendo nicotina [35]. Frohlich *et al.*, 2003, encontraram resultados semelhantes em avaliação de 4516 indivíduos. O grupo encontrou, especificamente em homens, que o hábito tabagista está relacionado com a deficiência no aumento sanguíneo dos níveis de IgG em infecções crônicas. Os autores mostram que a nicotina age sobre as células T, conferindo um benefício subclínico de imunossupressão e ação antiinflamatória. No entanto, estes pacientes fumantes tenderiam a ter outros sintomas devido a outras substâncias presentes no cigarro, não tendo influência clínica sobre o curso do LES [36]. Já em mulheres, a nicotina pode atuar sobre os níveis hormonais, através do seu efeito antiestrogênico. O estrogênio é conhecido por seu efeito moderador sobre doenças como a artrite reumatóide, e muitas mulheres grávidas, obtêm alívio sintomático da doença durante

este período. Através da modulação do equilíbrio hormonal, a nicotina pode aliviar alguns processos inflamatórios [37].

Diversos estudos epidemiológicos têm confirmado o aparente efeito protetor do tabagismo sobre algumas doenças. A presença de associações inversas entre o fumo de cigarro e o mal de Parkinson hoje já estão bem estabelecidas, demonstrando que fumantes possuem um risco relativo de cerca de 0,5 em comparação a não fumantes, em desenvolver a doença [42, 43]. Embora a maioria destes estudos seja transversal ou caso-controle, estudos de coorte e de mortalidade também confirmaram esses achados. Além disso, a nicotina pode reduzir o efeito de várias doenças do sistema motor extrapiramidal, além da doença de Parkinson. Pode reduzir o parkinsonismo induzido por drogas, aliviar a síndrome de Tourette e piorar a discinesia tardia Induzida por neurolépticos, efeitos relacionados à ação sobre o sistema dopaminérgica motor [38]. Em recente publicação, os autores sugerem que o consumo elevado de cigarro (20-30 unidades por dia) conduz a um inexplicável fator de proteção para pacientes com artrite reumatóide, relatando uma significativa redução na progressão da doença. No mesmo trabalho, discute-se a possibilidade da ingestão de altas quantidades de nicotina ter um efeito antiinflamatório no processo erosivo da artrite reumatóide [4]. Entretanto a maioria dos estudos demonstra que o tabagismo ainda é um fator de risco para a artrite reumatóide.

2.1.1 O Tabagismo e o Lupus Eritematoso Sistêmico

A grande maioria dos trabalhos científicos aponta que a etiopatogenia das doenças autoimunes são multifatoriais na natureza. Fatores ambientais, como a exposição a agentes infecciosos, vacinas, medicamentos, stress e tabagismo, estão associados com a predisposição de certos indivíduos ao desenvolvimento de doenças auto-imunes [44]. Estudos existentes apresentam evidências conflitantes sobre o papel do tabagismo no desenvolvimento e na gravidade das doenças auto-imunes. Embora as vias biológicas pelas quais o fumo do cigarro age no aumento da prevalência de fenômenos auto-imunes ainda não estarem plenamente caracterizadas, existem fortes evidências ligando o tabagismo à presença de artrite reumatóide (AR) e lúpus eritematoso sistêmico (LES) [39].

Em revisão feita por Hardy *et al.*, os pesquisadores descrevem algumas substâncias associadas com a indução de lúpus, tais como a minociclina, sulfasalazina e principalmente procainamida e hidralazina, que possuem anéis aromáticos e hidralazinas, sendo amplamente encontradas na fumaça do tabaco [40]. Também é possível que a fumaça do cigarro leve a uma liberação de antígenos intracelulares por hipóxia, necrose e interferência no apoptose. Esta exacerbação de exposição à auto antígenos, sem uma capacidade adequada na depuração e limpeza pelo sistema imunológico, como pela MBL e o complemento, poderia levar a uma reação auto-imune em indivíduos suscetíveis [1]. Em um estudo retrospectivo, altos títulos de anti-DNA de fita dupla (dsDNA) foram encontrados em fumantes ativos e ex-fumantes em relação aos não-fumantes (OR 4,0 e 1,4, respectivamente). Os autores discutem que os componentes do cigarro podem ter a capacidade de alterar as moléculas do DNA de cadeia dupla, formando moléculas modificadas e, portanto, adquirem a capacidade imunogênica de formar autoanticorpos anti-DNA [41].

Boeckler *et al.*, em um estudo relacionando tabagismo e lúpus eritematoso cutâneo, sugerem que o cigarro possui um efeito cumulativo em relação ao tempo de exposição. Ao analisar o lapso de tempo entre o início do tabagismo e os primeiros sinais da doença, observa a existência de uma relação entre o número de maços-ano e o risco de LE. No mesmo trabalho, mostra que a média de idade para o início do tabagismo foi bastante precoce (18 anos), com um elevado número de cigarros fumados por dia (média de 15 cigarros por dia). De um modo geral, o estudo fornece fortes evidências de um efeito cumulativo e dose-dependente, sendo que envolvimento cutâneo parece ser o principal alvo apresentado pelo trabalho [42]. Em outro trabalho, Hardy *et al.*, também sugerem um efeito dose-dependente, mas a diferença entre maços-ano de pacientes e controles não foi significativa [43]. O cigarro também poderia estar atuando no surgimento do LES, através de concentrações extremamente elevadas de radicais livres de oxigênio (ROS) contidas na fumaça. Além de aumentar a produção e ativação de radicais livres endógenos, estas toxinas interagem com o DNA e podem causar mutações genéticas e ativação de gene que levam a manifestação de doenças auto-imunes [44].

Diferentes grupos têm investigado o efeito do cigarro, especificamente da nicotina, sobre a apoptose. Visto que a auto-imunidade pode estar associada a uma exposição excessiva à auto-antígeno, a desregulação da apoptose pela ação da

nicotina poderia estar envolvida com o surgimento do LES. Em vivo, Suzuki *et al.*, analisaram a ação da nicotina sobre a apoptose cardíaca induzida em ratos adultos. Ao pré-tratarem os ratos com nicotina, observaram uma maior sobrevivência quando induzidos a apoptose por lipopolissacarídeo (LPS) intravenosa, comparados aos controles. Paralelamente, observaram *in vitro*, o efeito da LPS em miócitos. Como resultado, células pré-tratadas com nicotina bloquearam em 50% a ação da LPS, mostrando uma ação inibitória da nicotina sobre a apoptose [45]. Em outro trabalho, o grupo de Wang *et al.* relata uma significativa redução na mortalidade por sepse induzida por LPS após tratamento com nicotina [46].

Em vitro, foi descrita a inibição da apoptose induzida por TNF- α , luz UV e drogas quimioterápicas em células cancerígenas. Como resultado, os autores sugerem que a exposição à nicotina pode levar a uma diminuição na eficácia no tratamento antitumoral e possivelmente promover o surgimento de novos tumores [47]. Em outro estudo, Onada *et al.* descrevem um efeito protetor da nicotina sobre apoptose induzida por cisplatina, radiação gama e ultravioleta em células tumorais de pescoço e cabeça. Além disso, a nicotina reduziu a fragmentação do DNA em 33% nesta linhagem de células [54]. Heeschen *et al.*, mostram que a nicotina aumenta em até 3 vezes, o número de células endoteliais humanas em cultura, provenientes de cordão umbilical e artérias coronárias. Mais além, a nicotina reduziu o número de células apoptóticas após 24h de exposição à hipóxia (3% de oxigênio) [48]. O acúmulo de neutrófilos nos pulmões está relacionado à patogênese de enfisemas e à bronquite crônica quando associados ao cigarro. Avaliando o papel da nicotina no acúmulo destes neutrófilos, Aoshiba *et al.* observaram a taxa de sobrevivência e tempo de vida destas células quando expostas a esta substância. Eles encontraram que a nicotina prolonga o tempo de vida de maneira dose dependente, através da supressão da apoptose, identificada por transmissão de elétrons e microscopia de fluorescência. Também notaram que as suas funções de quimiotaxia e geração de O₂ permaneceram preservadas [49]. De Rosa em 2005, relatou que a nicotina através da ativação dos receptores alpha 7 nAChR, quando usada de maneira repetida e dose dependente, reduz os percentuais de apoptose induzidas por cortisol em linfócitos humanos [50]. A dexametasona, medicamento de ação anti-inflamatória e imunossupressora, suprime processos inflamatórios de várias naturezas. Hakki *et al.* estudaram o efeito da nicotina na indução da apoptose

de células imunes murinas por esta droga. O grupo relata que a nicotina bloqueou em 65-100% a ativação de caspase-3 em tímócitos e células do baço [51].

Por outro lado, a nicotina também mostra-se capaz de induzir a apoptose. Em vivo, Bordel *et al.* utilizaram um modelo de hamster dourado para estudar a influência da nicotina sobre o crescimento folicular, vascularização e densidade de micro vasos em ovários. O grupo relata que a nicotina gerou uma inibição dose dependente do crescimento folicular. Mais além, através de imunohistoquímica a presença de caspase-3 clivada, o que revelou uma extensa quantidade de células foliculares em apoptose. Folículos tratados com baixas quantidades de nicotina apresentaram apenas algumas células positivas para caspase-3 [52]. Investigando o efeito da nicotina sobre a apoptose em epitélio bronquial e alveolar de ratas fêmeas, Demiralay *et al.* observaram um aumento da apoptose em 84% dos animais tratados comparado aos controles. Também encontraram uma elevação nos níveis locais de TNF- α , que poderiam estar contribuindo para o aumento da apoptose [60].

Em vitro, um grupo de pesquisadores expôs queratinócitos a fumaça de tabaco ou a uma concentração equivalente de nicotina pura. Ambas as substâncias aumentaram a expressão de NF-kappaB, p21, Bcl-2 e STAT-1, tanto em nível de mRNA como de proteína. Também foi observado o aumento de células apoptóticas com elevação na atividade da caspase-3 [54]. Villablanca descreveu uma atividade bimodal e dose dependente da nicotina sobre células endoteliais pulmonares. Baixas quantidades de nicotina (menores que as encontradas normalmente em fumantes) estimularam a proliferação destas células, ao passo que altas quantidades geraram diminuição na síntese de DNA e apoptose [53]. Mariggio investigou o efeito da nicotina sobre células NPM, isoladas de sangue periférico e incubadas em nicotina em uma concentração final de 0,01% e 0,3%. Houve um aumento significativo de células apoptóticas apenas naquelas expostas a alta concentração. Os autores também quantificaram a proporção de células NPM apoptóticas na fenda gengival de pacientes com periodontite e saudáveis, fumantes e não-fumantes. Os pacientes fumantes obtiveram um pronunciado aumento de células apoptóticas comparados aos não fumantes e controles [63].

Ao que parece, existem diversos resultados mostrando uma ação antiapoptótica perante o tabagismo e outras pesquisas mostrando o contrário. Uma grande parte dos trabalhos descreve a nicotina como uma droga próapoptótica, mesmo em baixas quantidades. No entanto, isto poderia estar indicando a presença

de altas concentrações sistêmicas e locais, fisiologicamente acima daquelas encontradas comumente em fumantes. Ao mesmo tempo, estas relações ambíguas também podem ser devido aos diversos modelos utilizados, bem como os diferentes métodos e interpretações subjetivas dos resultados, gerando dificuldades em se comparar a ação cigarro e especificamente da nicotina sobre a apoptose.

Apesar de o tabagismo ser proposto como um dos “gatilhos” para o desenvolvimento e gravidade do LES, alguns estudos ainda apresentam resultados conflitantes [54]. Costenbader *et al.* em uma meta-análise, concluiu que o tabagismo tem uma leve, mas significativa contribuição no desenvolvimento do LES, tendo um risco relativo (RR) de 1,50 (IC 95% 1.09 e 2.08) quando tabagista ativo. Não tendo um risco aumentado para os ex-fumantes [55]. Em um estudo prospectivo contando com 64.000 mulheres afroamericanas, o RR para a incidência do LES em fumantes ativos e ex-fumantes foi de 1,6, com um risco aumentado principalmente para mulheres que começaram a fumar antes dos 19 anos [56]. Ghaussy *et al.* investigaram o impacto do tabagismo sobre a atividade da doença em pacientes com LES. Fumantes ativos demonstraram significativamente maior atividade da doença que ex-fumantes e não fumantes [57]. Em outro estudo, tabagistas ativos tiveram um comprometimento cutâneo mais grave quando comparados ao ex-fumantes ou não fumantes [42]. Pacientes com LES fumantes também foram descritos por sofrer mais episódios de pleurite e peritonite e manifestar mais sintomas neuropsiquiátricos [7], enquanto nefrite lúpica não parece estar relacionada ao tabagismo [58]. Um fator importante que deve ser ressaltado é que o tabagismo, além de ser um fator associado à etiopatogenia do LES, também influencia no tratamento. O hábito tabagista modifica a farmacocinética de medicamentos imunossupressivos alterando o efeito terapêutico, a absorção intestinal, a eliminação plasmática e aumentando o metabolismo hepático, reduzindo assim as concentrações efetivas do medicamento. Um ótimo exemplo são os medicamentos antimalária, já bem descritos como sendo menos efetivo em tabagistas. Apesar do metabolismo destes medicamentos não ser bem compreendido, acredita-se que eles são inativados devido ao complexo enzimático do citocromo P450. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos encontrados na fumaça do cigarro são potentes indutores desta enzima e poderiam ser responsáveis por esta ineficiência [59]. Pacientes com LES e tabagistas também requerem doses terapêuticas maiores que aqueles não fumantes [7].

Em um contexto inflamatório como o gerado pela exposição dos pulmões a queima do cigarro, a fumaça pode levar a morte celular do trato respiratório através hipóxia e necrose, modular a apoptose, a proliferação de células, regular a liberação de citocinas e quimiocinas, alterar a apresentação de antígenos e as vias de morte de linfócitos. A presença desta inflamação crônica associadas a uma exposição a auto-antígenos pode induzir a formação de novos epítomos, por ação direta ou indireta de proteínas oxidantes ou pela interferência no depuramento de células apoptóticas e material intracelular. Tais circunstâncias poderiam levar a uma quebra de tolerância imunológica e possivelmente originar doenças auto-imunes como o SLE.

2.2 CONCEITO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica autoimune, de etiologia pouco conhecida, podendo afetar praticamente qualquer órgão ou sistema [60]. É uma doença que demonstra um complexo padrão de herança, com envolvimento multifatorial de suscetibilidades genéticas e ambientais [2, 60, 61]. Caracteriza-se pela perda de tolerância imunológica a antígenos do próprio organismo, incluindo uma gama de antígenos intracelulares [72, 73]. A presença de autoanticorpos patogênicos, imunocomplexos e linfócitos T direcionados contra as células e órgãos do corpo, geram danos teciduais e promove um quadro clínico variável, podendo levar a acometimento renal, hematológico, neurológico, entre outros [62]. Diante disso, convencionou-se realizar seu diagnóstico através da associação de um grupo de achados clínicos e laboratoriais, conforme os critérios de classificação propostos pelo *American College of Rheumatology* (ACR) em 1982 e revisados em 1997, detalhados no anexo I. Estes autoanticorpos, mesmo sendo uma das principais características do LES, podem variar de pessoa a pessoa, diferindo em número e concentração. Anti-DNA de dupla hélice, anti-cromatina e anti-histona, são alguns dos anticorpos frequentemente relacionados à etiopatogênese da doença [41, 60].

2.3 EPIDEMIOLOGIA DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Apesar de ser uma doença rara, o LES é registrado em todo o mundo e sua prevalência oscila de 15-50/100.000 habitantes. Não possuindo distribuição uniforme entre grupos raciais, gênero, idade, raça ou situação socioeconômica, podendo estes fatores, ter influência na expressão da doença [75-77]. Em um estudo epidemiológico incluindo os Estados Unidos, Ásia, Europa, Martinica e Austrália observou-se uma variação de incidência de 1 a 32 casos para cada 100.000 pessoas por ano. A prevalência foi maior nos países europeus quando comparados com os Estados Unidos. Dentre os países europeus, Espanha, Itália e França foram os que tiveram maior prevalência de LES [63]. No Brasil, estima-se uma incidência em torno de 8,7 casos para cada 100.000 pessoas por ano, sendo que em mulheres esta estimativa é de 14 casos ano e em homens é de 2,2 casos para cada 100.000 pessoas por ano. O LES é mais comumente visto nas mulheres, numa proporção de aproximadamente 9:1. Os primeiros sintomas começam a surgir principalmente na idade reprodutiva, geralmente entre a 2ª e 4ª década de vida, tendo o seu pico de incidência entre 35 e 39 anos, com incidência de 32,7 casos para cada 100.000 mulheres por ano [64]. Em crianças, essa razão é de 3:1; em adultos jovens chega a 14:1 e nos indivíduos de mais idade, novamente tende a ser menor, em torno de 8:1, sendo este fato é atribuído a fatores hormonais [80, 81].

2.4 ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

A etiologia do LES permanece pouco conhecida, mas provavelmente possui uma origem multifatorial, envolvendo fatores genéticos, imunológicos, hormonais e ambientais. Possivelmente gerada por uma perda da imunoregulação, o LES caracteriza-se pelo reconhecimento anormal de autoantígenos pelo sistema imune e a perda da tolerância imunológica, associada à falha nos mecanismos supressores, com subsequente ativação policlonal de linfócitos B. A produção de autoanticorpos leva a formação e deposição de imunocomplexos com ativação do complemento e consequentes processos inflamatórios, desencadeando lesões teciduais [82, 83].

Autoanticorpos dirigidos contra membranas celulares contribuem para as citopenias (anemia hemolítica, leucopenia, linfopenia e trombocitopenia), além de

outras manifestações detectadas na doença, como o envolvimento do sistema nervoso central [65]. Autoanticorpos dirigidos contra o complexo fosfolípide-beta-2-glicoproteína I são responsáveis por eventos tromboembólicos venosos e arteriais observados em pacientes com LES. A injúria celular promovida por estes autoanticorpos e pela ativação do sistema do complemento (SC) predispõe ao surgimento de novos autoantígenos, que mantém a estimulação da resposta imunológica, levando a uma perpetuação da resposta autoimune [85]. Sem uma causa bem descrita, sabe-se que a doença está ligada a uma conjunção de fatores ambientais e genéticos.

Dentre os fatores ambientais, vários deles podem exacerbar ou até desencadear a doença em indivíduos que apresentam alguma predisposição. Os fatores mais conhecidos são a luz ultravioleta [1], infecções [2], fatores étnicos [60, 66] e socioeconômicos [67]. Os raios ultravioletas podem estimular os queratinócitos a expressarem antígenos nucleares em sua superfície e aumentar a secreção de citocinas que estimulam linfócitos B à produção de anticorpos autoreativos [86, 87]. Infecções causadas por vírus, dentre eles o vírus Epstein-Barr, poderiam contribuir para o desenvolvimento de autoimunidade, principalmente por mimetismo molecular [88]. Outros vírus, como Citomegalovírus, Parvovírus B19 e alguns retrovírus, também foram associados ao desenvolvimento do LES. Algumas substâncias como procainamida, hidralazina e isoniazida desencadeiam um quadro conhecido como lúpus induzido por drogas, que é caracterizado pelo surgimento de manifestações clínicas após exposição a essas drogas ou outras menos frequentes, sendo que após a suspensão das mesmas, há completo desaparecimento das alterações clínicas e laboratoriais [7, 46]. Outros fatores ambientais como pó de sílica e tabagismo foram encontrados em maior prevalência em pacientes com LES, sugerindo uma possível associação destes com a doença [55, 68, 69]. Alguns estudos também mostram que a fumaça do tabaco possui aminas aromáticas lupogênicas, agravando o lúpus cutâneo e tornando-o menos responsivo aos tratamentos [42].

Claramente, o LES é uma complexa doença autoimune suscetível a fatores poligênicos e multigênicos, possuindo uma grande heterogeneidade fenotípica, como sugere a grande variedade de manifestações clínicas e laboratoriais [70]. É possível, por exemplo, que dois indivíduos com LES tenham diagnósticos completamente diferentes de acordo com os critérios de classificação encontrados.

Isto implica que o LES pode ser ocasionado por múltiplas vias, cada uma causada, em parte, por um distinto conjunto de genes [60]. Crianças nascidas de mães com LES têm teste positivo para fator anti-nuclear em cerca de 27% dos casos, sem necessariamente desenvolver quadro clínico compatível [71]. O achado de outras doenças autoimunes em familiares de pacientes com LES e sua associação com outros distúrbios geneticamente determinados, também reforçam a importância da predisposição genética para o surgimento da doença. Aparentemente, uma combinação de fatores genéticos, tanto a presença de genes de susceptibilidade quanto a ausência de genes de proteção, é requerida para atingir risco suficiente para o surgimento da doença.

Muitos estudos de rastreamento de ligação genética têm sido realizados e uma meta-análise mostrou três regiões mais consistentemente relacionadas com LES: 6p21.1-q15, 20p11-q13.13 e 16p13-q12.2. [72]. Dentre estes fatores genéticos, alguns estão relacionados aos componentes do complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex* - MHC). Destes, aqueles que mais se destacam são o *HLA-DR2* e *HLA-DR3*. A associação destes genes deve-se à modulação exercida por hormônios (estrógeno, progesterona, prolactina) sobre a produção de citocinas, reações inflamatórias e morte celular (apoptose) [70, 94], mostrando uma forte associação com LES.

O papel dos receptores do Fcy (FcyRs – Fcy receptors) também têm melhoraram consideravelmente nos últimos anos. Variações alélicas do gene dos FcyRs reduzem a afinidade de ligação em subclasses de IgG, influenciando a atividade biológica de fagócitos e promovendo a base para predisposição ao LES [73]. Recentemente, foi descrita uma relação dos receptores *toll like* (TLR – *toll-like receptors*) com o reconhecimento de auto-antígenos e produção de auto-anticorpos. No LES em atividade, foi encontrado aumento da proporção de células B de memória e células plasmáticas expressando TLR-9, evidenciando uma possível contribuição destes receptores na patogênese do LES [74].

Várias outras anormalidades têm sido descritas no LES. O antígeno 4 de linfócitos T-citotóxico (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 - CTLA-4), possui estrutura homóloga ao CD28, um importante regulador negativo de doenças autoimunes. Em trabalho recente, mostrou-se que os polimorfismos no gene do *CTLA-4* estão associados a diversos tipos de doenças autoimunes, sugerindo tais variações como um dos candidatos na patogênese do LES [60]. Ainda há descrição de outros

polimorfismos genéticos de citocinas, receptores de citocinas, alelo nulo do gene da enzima glutathione S-transferase que levam ao LES. Atividades anormais de proteinoquinasas, fosfatases e moléculas de sinalização intracelular, dentre elas a proteína tirosina fosfatase N22 (PTPN22 - *protein tyrosine phosphatase N22*) e níveis anormais de opsoninas, citocinas e quimiocinas também estão relacionadas a etiologia do LES. O interferon alfa (*IFN- α*) foi a primeira citocina associada à atividade clínica do LES. Seguindo a teoria de Rönnblom e Alm, o *IFN- α* gera um círculo vicioso nas várias fases do desencadeamento do LES e estudos mostram que a inibição do *IFN- α* e seus receptores, pelo uso de anticorpos monoclonais anti-*IFN- α* , podem ser eficientes no tratamento da doença [73].

Em suma, todos estes fatores podem estar potencialmente alterando a regulação imune através da degradação de proteínas, alteração no transporte de peptídeos, diminuindo o funcionamento do sistema reticuloendotelial, gerando imunoglobulinas, desregulando a apoptose ou até mesmo levando à produção e liberação de hormônios [75]. Ainda sim, há outros dois fatores importantes no desenvolvimento do LES com as deficiências nos componentes do complemento C2, C4, C1q e C1r/s e da lectina ligadora da manose (*mannose binding lectin* - MBL) [76, 77]. Ambas as proteínas estão relacionadas à depuração de materiais biológicos e defeitos nesta depuração, pode levar à uma estimulação exacerbada do sistema imune como a produção de anticorpos autoreativos, resultando em processos fisiopatológicos envolvidos na patogênese do LES [78].

2.5 O SISTEMA COMPLEMENTO

O SC é uma cascata bioquímica que compreende um complexo conjunto de mais de 20 proteínas nanoenzimáticas essenciais para a operação do sistema imunológico inato e adaptativo. Com isto, o SC não só media a destruição de microorganismos invasores e estimula a resposta imune específica clonal, como também é co-responsável pela remoção de imunocomplexos [79]. Existem três vias para a ativação do complemento: a via clássica, a via alternativa e a via das lectinas. A via clássica, dependente de anticorpos, é ativada por imunocomplexos com imunoglobulina (Ig)G (exceto IgG4) e IgM, que se ligam através da porção Fc a domínios de C1q, envolvendo os componentes C1, C2 e C4. A via alternativa é iniciada pela ligação covalente de pequenas porções de C3b à componentes estruturais protéicos ou de carboidratos encontrados em microorganismo e células anormais. Essa via é composta por seis proteínas (C3, fator B, fator D, fator H, fator I e properdina), caracterizando-se por um estado de constante ativação devido à hidrólise espontânea tiol-éster do componente C3 [80]. Por fim, a via das lectinas é mediada pela interação da proteína MBL ao grupamento de manose terminal na superfície de certas bactérias e fungos, desencadeando eventos semelhantes aos que ocorrem na via clássica [81]. As três vias convergem para a geração da C3b convertase, a qual cliva o C3, produzindo a forma ativada C3b. A ligação de C3b a C3b convertase gera um complexo trimolecular capaz de ligar e clivar C5. Este complexo inicia a via terminal do complemento, que resulta na formação do complexo de ataque à membrana, cuja ação é alterar a integridade da membrana celular, levando à lise. Além disso, C3b em conjunto com C4b, atua nos processos de opsonização, enquanto C3a e C5a atuam como mediadores inflamatórios [91].

Deficiências herdadas e adquiridas do SC estão associadas com algumas doenças autoimunes. Para que exista uma tolerância imunológica e homeostasia, é necessário que o *clearance* de todo material apoptótico seja feito sem uma reação inflamatória exacerbada. As células em apoptose, ao serem opsonizadas por componentes do complemento ou por pentraxinas, tais como a proteína C reativa, componentes amiloide P e pentraxina-3, são fagocitadas por macrófagos e células dendríticas, as quais secretam citocinas que induzem um estado de tolerância imunológica [101]. Em doenças reumatológicas como o LES, a deficiência,

disfunção ou inativação destas pentraxinas e componentes do complemento (como C1q e a MBL), podem levar a necrose destas células, em vez da resposta normal de apoptose, a qual provoca a liberação de citocinas pró-inflamatórias que podem facilitar a perda de autotolerância [102, 103]. Assim, a associação entre a deficiência do SC e o desenvolvimento de doenças autoimunes estaria relacionada à deficiência na depuração de células mortas e imunocomplexos pelos componentes da via clássica (C1q, C1r, C1s, C4 e C2 [62] e pela deficiência da MBL [82]). Outra hipótese seria que o complemento representa um limitador de ativação para células T e B. Ao mesmo tempo em que o SC pode estimular a vasodilatação, o fluxo sanguíneo, a diapedese de leucócitos e quimiotaxia, a ausência desta proteína como moduladora da resposta inflamatória, perturbaria a tolerância a auto-antígenos [83].

O SC é particularmente interessante no contexto do LES, pois ele é responsável pela depuração de imunocomplexos [79, 84] e células apoptóticas [98, 107]. A sua deficiência ou inativação é a principal chave para danos em tecidos e disfunção de órgãos no LES [105, 106].

2.5.1 A Letina Ligadora da Manose e o Lúpus Eritematoso Sistêmico

A MBL é uma proteína produzida pelo fígado, da família das colectinas que está intimamente relacionada ao sistema imune de defesa inato [73]. Estas colectinas possuem uma estrutura baseada em 3 cadeias de polipeptídeos de 32 kDa, cada uma com um domínio lectina, uma região hidrofóbica alfa-hélice, uma região de colágeno e uma região N-terminal rica em cisteína. A MBL tem um formato de “buquê”, semelhante ao formato de C1q e se liga a diversos tipos de carboidratos encontrados na superfície de microorganismos (vírus, bactérias, protozoários, fungos) mediando um efeito antimicrobiano, destruindo-os diretamente via opsonização, fagocitose e ativação do SC [79, 85].

A diferenciação no reconhecimento entre células próprias e não-próprias pela MBL reside na especificidade do domínio de reconhecimento de carboidratos (DRC) e no seu arranjo espacial entre outros DRC das células encontradas. A MBL reconhece e liga-se principalmente a moléculas de carboidratos do tipo glicanos, lipofosfoglicanos e gliconitol-fosfolipídios com manose, glicose, fucose ou N-acetilglicosaminas. Este tipo de reconhecimento foi relatado como um padrão de

reconhecimento microbiano [83]. Deste modo, a MBL é muito eficiente ao reconhecer superfícies virais, bacterianas e fúngicas que dispõem de altas e repetitivas quantidades de resíduos de manose e/ou N-acetilglicosaminas (ficolinas) tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* [91, 94]. O ácido siálico é conhecido por proteger as células da maioria dos mamíferos da ligação com a MBL. No entanto, células em fase apoptótica tendem a perder seus resíduos de ácido siálico levando a uma crescente exposição de manose, N-acetilglicosaminas e fucose, permitindo assim a ligação com a MBL e a depuração das mesmas [86].

A MBL é a única colectina já relatada capaz de ativar o sistema do complemento e reforçar a resposta inflamatória [79]. Duas esterases séricas foram encontradas e relacionadas à MBL, MASP-1 e MASP-2 (MBL-associated serine proteases). A interação entre elas resulta na formação do complexo MBL [110]. Através de análises de sequência foi demonstrado que sua estrutura de domínio é altamente conservada e idêntica aos componentes do complemento C1r e C1s da via clássica do complemento, resultando na ativação do SC através da clivagem de C3 e C4 [70]. A MBL e MASP mostram uma organização estruturalmente de três a seis subunidades covalentes interligadas. Recentemente, pesquisas destacam que a presença de diferentes tamanhos destes oligômeros se designa para distintas funções na ativação do complemento pela via alternativa da MBL [70, 87].

Os níveis circulantes de MBL estão sobre controle genético e dependem das variações alélicas que podem levar a baixas quantidades circulantes, enquanto outras a maiores [60, 88]. Estudos demonstram que a presença do alelo para baixa quantidade de MBL, leva à episódios de infecções mais frequentes relacionados à epiderme, mucosas e trato respiratório inferior [4, 79]. A MBL é conhecida com uma proteína de fase aguda [89]. Os níveis plasmáticos podem se elevar de 1.5 a 3 vezes durante processos inflamatórios e infecciosos, como pacientes submetidos à cirurgia e com malária, podendo variar entre diferentes indivíduos [90]. Previamente descreveu-se que a porção promotora do gene da MBL contém elementos de resposta para a fase aguda [70, 72]. Maffey *et al.*, em 2005, analisaram a relação entre periodontite e os níveis de MBL. Apesar de não observarem uma correlação da MBL com a doença, encontraram um inesperado e significativo aumento nos níveis plasmáticos da proteína em indivíduo sem a doença, mas tabagistas pesados (> dez cigarros por dia) ou que tinham altas quantidades de cotinina circulantes, um dos

catabólitos da nicotina [2]. Este fato nunca foi descrito antes na literatura. Os autores discutem que esta observação poderia estar relacionada ao fato do cigarro possuir um efeito sistêmico e agir como um fator de inflamação crônica. Mesmo a MBL sendo uma proteína de fase aguda, a fumaça do cigarro poderia estar estimulando positivamente os níveis de MBL na circulação. Ainda assim, o cigarro também está associado a uma diminuição nos níveis de IgG em processos infecciosos crônicos [40, 114]. Desta forma, os autores especulam que a MBL poderia estar mais elevada nestes indivíduos, como um mecanismo compensatório para a ativação da via clássica do complemento durante infecções crônicas.

O gene que codifica a MBL compreende 4 exons interruptos e 3 íntrons, localizados no braço longo do cromossomo 10 (q11.2–q21). A região do exon 1 codifica o peptídeo sinalizador, uma região rica em cisteína e também parte da região de colágeno, rico em glicina. O exon 2 codifica o restante da região de colágeno. O exon 3 codifica a região alfa-hélice e o exon 4 codifica o domínio de reconhecimento do carboidrato C-terminal [91]. Vários polimorfismos localizados neste gene têm sido identificados, resultando principalmente na deficiência de MBL. Três mutações pontuais foram descritas no exon 1 nos códonos 52, 54 e 57 [92-94]. Respectivamente são referidas como variantes alélicas D (mutação Arg→Cys), B (mutação Gly→Asp) e C (mutação Gly→Glu). A presença de qualquer um dos três polimorfismos encontrados no exon 1 é designada como alelo O [60]. A variante A é descrita como alelo selvagem, encontrado na grande maioria das populações. Essas mutações causam alterações estruturais que determinam baixos níveis séricos da MBL [114, 115, 117]. A presença de homozigose para alelos minoritários resulta em praticamente completa deficiência da MBL circulante. Nos heterozigotos com a presença de um dos alelos B ou C, o efeito em diminuir os níveis séricos é maior do que com a presença de um alelo D [95]. O alelo B ocorre em aproximadamente 26% dos indivíduos euro-descendentes, enquanto o alelo C ocorre entre 50% e 60% dos indivíduos afro-descendentes [116].

Na região promotora do gene foram identificados outros 3 polimorfismos nas posições -550, -221 e +4, com as respectivamente variantes alélicas H/L, X/Y e P/Q [115, 116, 118]. Quando combinados, quatro haplótipos promotores são comumente encontrados: LXP, LYP, LYQ e HYP. Destes, o HYP é o único associado com níveis aumentados de MBL, enquanto o haplótipo LXP é encontrado em associação com deficiência de MBL circulante. Devido ao forte desequilíbrio de ligação encontrado

nestas variantes do gene da MBL, existem sete haplótipos promotores comumente encontrados. Os HYP/A e LYQ/A estão relacionados a altas quantidades circulantes de MBL. LYP/A XA/A, HAY/O estão associados a quantidades intermediárias e LXP/A, LYPB, HYPD e LYQC, resultam em baixas quantidades ou ausência da proteína [61, 96-98]. As distribuições destes haplótipos podem variar em relação à origem étnica de diferentes grupos.

Além dos diversos relatos de associação entre a deficiência da MBL com infecções, há vários estudos mostrando uma possível relação com a suscetibilidade a doenças auto-imunes e o LES. Em 1995, Davis *et al.*, estudando pacientes euro-descendentes com LES, encontraram uma frequência de 41% versus 30% nos controles, do alelo B, porém esta diferença não era estatisticamente significativa [99]. O mesmo autor, três anos mais tarde, verificou em pacientes afro-descendentes que pelo menos um alelo (B ou C) era encontrado mais frequentemente em pacientes com LES (60% versus 42% nos controles), porém novamente a diferença não apresentava-se estatisticamente significativa, com *odds ratio* (OR) de 1,7 e intervalo de confiança (IC) 95%=0,8-3,6. As frequências dos alelos C e B foram respectivamente 54% e 15% nos pacientes e 45% e 11% nos controles [100]. Sullivan *et al.*, em 1996, mostraram uma maior frequência do alelo B (0,163 versus 0,087 com $p < 0,05$) e C (0,125 versus 0,047 com $p < 0,05$) em pacientes afro-descendentes norte-americanos com LES [101]. Garred *et al.*, em 2001, observaram um aumento estatisticamente significativo na presença dos genótipos A/O e O/O, quando comparados com o genótipo A/A, em casos e controles, além de um risco maior de infecções nos pacientes com LES. Também conduziram uma meta-análise que evidenciou um OR de 1,6 (IC95%=1,3 – 2,0) para a presença dos genótipos A/O e O/O nos pacientes com LES [102]. Todos estes resultados sugerem que a MBL confere uma proteção contra o LES e que sua deficiência pode estar relacionada com surgimento da doença.

Alguns autores tentam evidenciar se os diferentes polimorfismos do gene da MBL têm alguma influência nas características clínicas e laboratoriais da doença. Takahashi *et al.* não observaram diferença estatística nas alterações fenotípicas e imunológicas estudando o alelo B, porém observaram maior número de infecções e discreta diminuição de C3 e CH50 nos pacientes com homozigose para este polimorfismo [126]. A relação entre o maior número de infecções em pacientes que apresentam alelos mutantes ainda é muito controversa. Outros estudos tentaram

correlacionar os polimorfismos com eventos cardiovasculares. Font *et al.* observaram que pacientes com o genótipo associado com deficiência de MBL têm um OR de 3,1 para ter doença cardiovascular. Estes pacientes, no entanto, também tinham maior prevalência de anticorpos antifosfolípidos, o que pode ter sido um fator de confusão [103]. Ohlenschlaeger *et al.* correlacionaram de maneira significativa, variantes alélicas para deficiência de MBL com risco aumentado de trombose arterial [104]. Calvo-Alen *et al.* encontraram relação entre variantes alélicas da MBL com doença cerebrovascular em pacientes euro-descendentes com LES, sugerindo que a influência destes alelos sobre doenças tromboembólicas ocorra em determinados grupos étnicos [88]. Estudo com mulheres lúpicas das Ilhas Canárias não evidenciou a deficiência de MBL como fator de risco, mas correlacionou com baixa frequência de anticorpos auto-reativos e surgimento mais tardio da doença [105]. Bertoli *et al.* publicaram estudo de pacientes norte-americanos, mostrando que os alelos mutantes da MBL correlacionam-se com menor probabilidade de serosite (56% versus 65%, com $p=0,0506$), envolvimento renal (45% versus 55%, com $p=0,479$) e anticorpos antifosfolípidos (27% versus 36%, com $p=0,496$), enquanto apresentam maior risco de leucopenia (63% versus 51%, com $p=0,0125$) [106]. Piao *et al.* encontraram uma prevalência significativamente maior da presença do anticorpo anti-Sm associado com genótipos A/B e A/C em pacientes lúpicos norte-americanos. No mesmo estudo, os autores concluíram que variantes alélicas mutantes em homozigose parecem modificar o curso da doença, havendo maior frequência de acometimento renal [107]. Recentemente, Jakab *et al.*, estudando pacientes lúpicos chineses, encontraram um significativo aumento na frequência de LES de início precoce (≤ 20 anos) entre os homozigotos XA/XA (17,4%) quando comparado com os demais pacientes (5,6%). Esses pacientes também apresentaram significativamente maior prevalência de manifestações cutâneas e serosite [108].

Outro fator interessante é a presença de anticorpos anti-MBL em pacientes com deficiência de MBL. Isto poderia explicar a existência da deficiência de MBL na ausência de anormalidades genéticas e auxiliaria no entendimento da variação das concentrações séricas de MBL em pacientes com a mesma mutação genética. Os resultados de alguns estudos, no entanto, têm sido controversos. Anticorpos anti-MBL podem ligar-se à MBL, diminuindo seus níveis séricos e ocasionando depósito destes imunocomplexos nos tecidos, o que contribuiria para lesão em órgão alvo. Seelen *et al.*, primeiramente demonstraram a presença de anticorpos anti-MBL em

pacientes com LES, mas não encontraram associação com níveis baixos de MBL. Os autores deste estudo sugerem um possível efeito destes anticorpos na atividade funcional da MBL circulante [109]. Mok *et al.* encontraram IgG anti-MBL em 23,7% dos pacientes com LES e 10% dos controles saudáveis ($p=0,04$). Níveis séricos de IgG anti-MBL tiveram correlação positiva com níveis séricos de MBL nestes pacientes. Anti-MBL IgM foi encontrado em uma pequena fração dos pacientes, sugerindo que a produção de anti-MBL no LES possa ser um processo voltado para antígeno específico e não resultado de ativação policlonal, na qual seria esperada produção de anticorpos IgM. Os níveis de anti-MBL, no entanto, não tiveram correlação com a atividade global da doença [110]. Shoenfeld *et al.* identificaram elevação dos títulos de anti-MBL em pacientes com LES em remissão e os autores sugerem que estes anticorpos possam ter papel patogênico no desenvolvimento e na perpetuação da auto-imunidade no LES [112]. No entanto, o significado real do anticorpo anti-MBL no LES ainda permanece incerto e necessita de maiores esclarecimentos.

Os diferentes mecanismos envolvidos na etiopatogênese do LES estão sendo conhecidos gradualmente. A influência genética é apenas uma pequena parte deste complexo emaranhado de fatores que atuam em conjunto, não somente para desencadeamento da doença, mas também para determinar a forma de evolução e o prognóstico. Ambos os tipos de polimorfismos, estrutural e promotor do gene *MBL-2*, estão aumentados em pacientes com LES de diferentes origens étnicas. A influência destes polimorfismos em determinados grupos pode ser seletiva, havendo diferenças quanto à magnitude do risco relativo. Além da predisposição ao LES, a MBL pode estar relacionada com algumas expressões fenotípicas próprias da doença ou mesmo eventos cardiovasculares. Visto que a MBL é capaz de depurar imunocomplexos e células apoptóticas e que o tabagismo tem um possível papel modulador nos seus níveis circulantes, acredita-se que a interação entre estes dois fatores possa alterar a expressão fenotípica da doença, assim como influenciar os índices de atividade, cronicidade e dano.

Desta forma, o avanço no entendimento das diferentes variantes alélicas da MBL relacionado a fatores ambientais, certamente contribuirão para maiores esclarecimentos sobre a etiopatogenia da doença. Por fim, a realização deste trabalho tem como objetivo avaliar o papel dos haplótipos associados aos níveis de MBL circulante e hábito tabagista em pacientes com LES.

3 OBJETIVOS

1- Avaliar os índices de atividade (SLEDAI) e de cronicidade (SLICC) da doença em relação ao hábito tabagista e os haplótipos relacionados à produção da MBL em pacientes com LES.

2 - Avaliar se existe interação entre o hábito tabagista e os haplótipos da MBL em relação a outras características clínicas e laboratoriais da doença.

4 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

1. Monticielo, O.A., Chies J.A., Mucenic T, Rucatti G.G., Júnior J.M., da Silva G.K., Glesse N, dos Santos B.P., Brenol J.C., Xavier R.M., *Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus*. *Lupus*, 2010. **19**(3): p. 280-7.
2. Maffei, G., et al., *Plasma levels of mannan-binding lectin in relation to periodontitis and smoking*. *J Periodontol*, 2005. **76**(11): p. 1881-9.
3. Arnson, Y., Y. Shoenfeld, and H. Amital, *Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity*. *J Autoimmun*, 2010. **34**(3): p. J258-65.
4. Westhoff, G., R. Rau, and A. Zink, *Rheumatoid arthritis patients who smoke have a higher need for DMARDs and feel worse, but they do not have more joint damage than non-smokers of the same serological group*. *Rheumatology (Oxford)*, 2008. **47**(6): p. 849-54.
5. Yanbaeva, D.G., et al., *Systemic effects of smoking*. *Chest*, 2007. **131**(5): p. 1557-66.
6. Sopori, M.L. and W. Kozak, *Immunomodulatory effects of cigarette smoke*. *J Neuroimmunol*, 1998. **83**(1-2): p. 148-56.
7. Rubin, R.L., et al., *Effect of cigarette smoke on autoimmunity in murine and human systemic lupus erythematosus*. *Toxicol Sci*, 2005. **87**(1): p. 86-96.
8. Bermudez, E.A., et al., *Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women*. *Am J Cardiol*, 2002. **89**(9): p. 1117-9.
9. Glossop, J.R., P.T. Dawes, and D.L. Matthey, *Association between cigarette smoking and release of tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors by peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2006. **45**(10): p. 1223-9.
10. Lindblad, S.S., et al., *Smoking and nicotine exposure delay development of collagen-induced arthritis in mice*. *Arthritis Res Ther*, 2009. **11**(3): p. R88.
11. Edwards, D., *Immunological effects of tobacco smoking in "healthy" smokers*. *COPD*, 2009. **6**(1): p. 48-58.
12. Skold, C.M., et al., *Chronic smoke exposure alters the phenotype pattern and the metabolic response in human alveolar macrophages*. *Clin Exp Immunol*, 1996. **106**(1): p. 108-13.
13. Noakes, P.S., P.G. Holt, and S.L. Prescott, *Maternal smoking in pregnancy alters neonatal cytokine responses*. *Allergy*, 2003. **58**(10): p. 1053-8.
14. Robbins, C.S., et al., *Cigarette smoke exposure impairs dendritic cell maturation and T cell proliferation in thoracic lymph nodes of mice*. *J Immunol*, 2008. **180**(10): p. 6623-8.
15. Hoser, G., et al., *Lymphocyte subsets differences in smokers and nonsmokers with primary lung cancer: a flow cytometry analysis of bronchoalveolar lavage fluid cells*. *Med Sci Monit*, 2003. **9**(8): p. BR310-5.
16. Takeuchi, M., et al., *Inhibition of lung natural killer cell activity by smoking: the role of alveolar macrophages*. *Respiration*, 2001. **68**(3): p. 262-7.
17. Smith, M.R., et al., *Smoking status and differential white cell count in men and women in the EPIC-Norfolk population*. *Atherosclerosis*, 2003. **169**(2): p. 331-7.

18. Tell, G.S., et al., *The relationship of white cell count, platelet count, and hematocrit to cigarette smoking in adolescents: the Oslo Youth Study*. *Circulation*, 1985. **72**(5): p. 971-4.
19. Corberand, J., et al., *Effect of tobacco smoking on the functions of polymorphonuclear leukocytes*. *Infect Immun*, 1979. **23**(3): p. 577-81.
20. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 767-811.
21. Vassallo, R., et al., *Cigarette smoke extract suppresses human dendritic cell function leading to preferential induction of Th-2 priming*. *J Immunol*, 2005. **175**(4): p. 2684-91.
22. Nouri-Shirazi, M. and E. Guinet, *Evidence for the immunosuppressive role of nicotine on human dendritic cell functions*. *Immunology*, 2003. **109**(3): p. 365-73.
23. Nouri-Shirazi, M. and E. Guinet, *A possible mechanism linking cigarette smoke to higher incidence of respiratory infection and asthma*. *Immunol Lett*, 2006. **103**(2): p. 167-76.
24. Nakajima, A., et al., *Roles of IL-4 and IL-12 in the development of lupus in NZB/W F1 mice*. *J Immunol*, 1997. **158**(3): p. 1466-72.
25. Huang, F.P., et al., *The role of interleukin 12 and nitric oxide in the development of spontaneous autoimmune disease in MRL/MP-lpr/lpr mice*. *J Exp Med*, 1996. **183**(4): p. 1447-59.
26. Goriely, S., R. Cavoy, and M. Goldman, *Interleukin-12 family members and type I interferons in Th17-mediated inflammatory disorders*. *Allergy*, 2009. **64**(5): p. 702-9.
27. Francus, T., et al., *Effects of tobacco glycoprotein (TGP) on the immune system. II. TGP stimulates the proliferation of human T cells and the differentiation of human B cells into Ig secreting cells*. *J Immunol*, 1988. **140**(6): p. 1823-9.
28. Tanigawa, T., et al., *Increase in memory (CD4+CD29+ and CD4+CD45RO+) T and naive (CD4+CD45RA+) T-cell subpopulations in smokers*. *Arch Environ Health*, 1998. **53**(6): p. 378-83.
29. Tollerud, D.J., et al., *The effects of cigarette smoking on T cell subsets. A population-based survey of healthy caucasians*. *Am Rev Respir Dis*, 1989. **139**(6): p. 1446-51.
30. Hersey, P., D. Prendergast, and A. Edwards, *Effects of cigarette smoking on the immune system. Follow-up studies in normal subjects after cessation of smoking*. *Med J Aust*, 1983. **2**(9): p. 425-9.
31. Costabel, U., et al., *Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes*. *Chest*, 1986. **90**(1): p. 39-44.
32. Gallowitsch-Puerta, M. and K.J. Tracey, *Immunologic role of the cholinergic anti-inflammatory pathway and the nicotinic acetylcholine alpha 7 receptor*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. **1062**: p. 209-19.
33. Kalra, R., et al., *Effects of cigarette smoke on immune response: chronic exposure to cigarette smoke impairs antigen-mediated signaling in T cells and depletes IP3-sensitive Ca(2+) stores*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000. **293**(1): p. 166-71.
34. Nizri, E., et al., *Activation of the cholinergic anti-inflammatory system by nicotine attenuates neuroinflammation via suppression of Th1 and Th17 responses*. *J Immunol*, 2009. **183**(10): p. 6681-8.

35. Madretsma, S., et al., *In-vivo effect of nicotine on cytokine production by human non-adherent mononuclear cells*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1996. **8**(10): p. 1017-20.
36. Frohlich, M., et al., *Independent association of various smoking characteristics with markers of systemic inflammation in men. Results from a representative sample of the general population (MONICA Augsburg Survey 1994/95)*. Eur Heart J, 2003. **24**(14): p. 1365-72.
37. Baron, J.A., *Beneficial effects of nicotine and cigarette smoking: the real, the possible and the spurious*. Br Med Bull, 1996. **52**(1): p. 58-73.
38. Newhouse, P.A. and J.R. Hughes, *The role of nicotine and nicotinic mechanisms in neuropsychiatric disease*. Br J Addict, 1991. **86**(5): p. 521-6.
39. Parikh-Patel, A., et al., *Risk factors for primary biliary cirrhosis in a cohort of patients from the united states*. Hepatology, 2001. **33**(1): p. 16-21.
40. Hardy, C.J., et al., *Smoking history, alcohol consumption, and systemic lupus erythematosus: a case-control study*. Ann Rheum Dis, 1998. **57**(8): p. 451-5.
41. Freemer, M.M., T.E. King, Jr., and L.A. Criswell, *Association of smoking with dsDNA autoantibody production in systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(5): p. 581-4.
42. Boeckler, P., et al., *Association of cigarette smoking but not alcohol consumption with cutaneous lupus erythematosus*. Arch Dermatol, 2009. **145**(9): p. 1012-6.
43. Hardy, C.J., et al., *Systemic lupus erythematosus (SLE) and hair treatment: a large community based case-control study*. Lupus, 1999. **8**(7): p. 541-4.
44. Pryor, W.A., et al., *Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage*. Chem Res Toxicol, 1998. **11**(5): p. 441-8.
45. Suzuki, J., et al., *Nicotine inhibits cardiac apoptosis induced by lipopolysaccharide in rats*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(3): p. 482-8.
46. Wang, H., et al., *Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis*. Nat Med, 2004. **10**(11): p. 1216-21.
47. Wright, S.C., et al., *Nicotine inhibition of apoptosis suggests a role in tumor promotion*. FASEB J, 1993. **7**(11): p. 1045-51.
48. Heeschen, C., et al., *Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis*. Nat Med, 2001. **7**(7): p. 833-9.
49. Aoshiba, K., et al., *Nicotine prolongs neutrophil survival by suppressing apoptosis*. J Lab Clin Med, 1996. **127**(2): p. 186-94.
50. De Rosa, M.J., et al., *Relationship between alpha 7 nAChR and apoptosis in human lymphocytes*. J Neuroimmunol, 2005. **160**(1-2): p. 154-61.
51. Hakki, A., et al., *Nicotine inhibition of apoptosis in murine immune cells*. Exp Biol Med (Maywood), 2001. **226**(10): p. 947-53.
52. Bordel, R., et al., *Nicotine does not affect vascularization but inhibits growth of freely transplanted ovarian follicles by inducing granulosa cell apoptosis*. Hum Reprod, 2006. **21**(3): p. 610-7.
53. Villablanca, A.C., *Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells in vitro*. J Appl Physiol, 1998. **84**(6): p. 2089-98.
54. Doria, A., et al., *Preventive strategies in systemic lupus erythematosus*. Autoimmun Rev, 2008. **7**(3): p. 192-7.
55. Costenbader, K.H., et al., *Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(3): p. 849-57.

56. Formica, M.K., et al., *Smoking, alcohol consumption, and risk of systemic lupus erythematosus in the Black Women's Health Study*. J Rheumatol, 2003. **30**(6): p. 1222-6.
57. Ghaussy, N.O., et al., *Cigarette smoking and disease activity in systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 2003. **30**(6): p. 1215-21.
58. McAlindon, T., et al., *Environmental factors predicting nephritis in systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 1993. **52**(10): p. 720-4.
59. Schein, J.R., *Cigarette smoking and clinically significant drug interactions*. Ann Pharmacother, 1995. **29**(11): p. 1139-48.
60. Nath, S.K., J. Kilpatrick, and J.B. Harley, *Genetics of human systemic lupus erythematosus: the emerging picture*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(6): p. 794-800.
61. Pine, S.R., et al., *Lung cancer survival and functional polymorphisms in MBL2, an innate-immunity gene*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(18): p. 1401-9.
62. Pickering, M.C., et al., *Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis*. Adv Immunol, 2000. **76**: p. 227-324.
63. Danchenko, N., J.A. Satia, and M.S. Anthony, *Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden*. Lupus, 2006. **15**(5): p. 308-18.
64. Vilar, M.J. and E.I. Sato, *Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil)*. Lupus, 2002. **11**(8): p. 528-32.
65. Cervera, R., et al., *Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus*. Medicine (Baltimore), 1993. **72**(2): p. 113-24.
66. Alarcon, G.S., et al., *Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. XIX. Natural history of the accrual of the American College of Rheumatology criteria prior to the occurrence of criteria diagnosis*. Arthritis Rheum, 2004. **51**(4): p. 609-15.
67. Ward, M.M. and S. Studenski, *Clinical manifestations of systemic lupus erythematosus. Identification of racial and socioeconomic influences*. Arch Intern Med, 1990. **150**(4): p. 849-53.
68. Ghaussy, N.O., W.L. Sibbitt, Jr., and C.R. Qualls, *Cigarette smoking, alcohol consumption, and the risk of systemic lupus erythematosus: a case-control study*. J Rheumatol, 2001. **28**(11): p. 2449-53.
69. Parks, C.G., et al., *Occupational exposure to crystalline silica and risk of systemic lupus erythematosus: a population-based, case-control study in the southeastern United States*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(7): p. 1840-50.
70. Gadjeva, M., S. Thiel, and J.C. Jensenius, *The mannan-binding-lectin pathway of the innate immune response*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(1): p. 74-8.
71. Murashima, A., et al., *Long term prognosis of children born to lupus patients*. Ann Rheum Dis, 2004. **63**(1): p. 50-3.
72. Forabosco, P., et al., *Meta-analysis of genome-wide linkage studies of systemic lupus erythematosus*. Genes Immun, 2006. **7**(7): p. 609-14.
73. Prokunina, L. and M. Alarcon-Riquelme, *The genetic basis of systemic lupus erythematosus--knowledge of today and thoughts for tomorrow*. Hum Mol Genet, 2004. **13 Spec No 1**: p. R143-8.

74. Papadimitraki, E.D., et al., *Expansion of toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for the induction and maintenance of the autoimmune process*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(11): p. 3601-11.
75. Theofilopoulos, A.N., *The basis of autoimmunity: Part II. Genetic predisposition*. Immunol Today, 1995. **16**(3): p. 150-9.
76. Ceribelli, A., et al., *Complement cascade in systemic lupus erythematosus: analyses of the three activation pathways*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1173**: p. 427-34.
77. Mullighan, C.G., S.E. Marshall, and K.I. Welsh, *Mannose binding lectin polymorphisms are associated with early age of disease onset and autoimmunity in common variable immunodeficiency*. Scand J Immunol, 2000. **51**(2): p. 111-22.
78. Monticelio, O.A., et al., *The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus*. Clin Rheumatol, 2008. **27**(4): p. 413-9.
79. Trouw, L.A., A.M. Blom, and P. Gasque, *Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells*. Mol Immunol, 2008. **45**(5): p. 1199-207.
80. Iturry-Yamamoto, G.R. and C.P. Portinho, *[Complement system: activation, regulation and congenita and acquired deficiency]*. Rev Assoc Med Bras, 2001. **47**(1): p. 41-51.
81. Cedzynski, M., et al., *Mannan-binding lectin insufficiency in children with recurrent infections of the respiratory system*. Clin Exp Immunol, 2004. **136**(2): p. 304-11.
82. Turner, M.W. and R.M. Hamvas, *Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations*. Rev Immunogenet, 2000. **2**(3): p. 305-22.
83. Markiewski, M.M. and J.D. Lambris, *The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight*. Am J Pathol, 2007. **171**(3): p. 715-27.
84. Bultink, I.E., et al., *Deficiency of functional mannose-binding lectin is not associated with infections in patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(6): p. R183.
85. Turner, M.W., *Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system*. Immunol Today, 1996. **17**(11): p. 532-40.
86. Saevarsdottir, S., T. Vikingsdottir, and H. Valdimarsson, *The potential role of mannan-binding lectin in the clearance of self-components including immune complexes*. Scand J Immunol, 2004. **60**(1-2): p. 23-9.
87. Thiel, S., et al., *A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 506-10.
88. Calvo-Alen, J., et al., *Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort: XXXIV. Deficient mannose-binding lectin exon 1 polymorphisms are associated with cerebrovascular but not with other arterial thrombotic events*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(6): p. 1940-5.
89. Ezekowitz, R.A., L.E. Day, and G.A. Herman, *A human mannose-binding protein is an acute-phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins*. J Exp Med, 1988. **167**(3): p. 1034-46.
90. Thiel, S., et al., *The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response*. Clin Exp Immunol, 1992. **90**(1): p. 31-5.

91. Takahashi, R., et al., *Anti-mannose binding lectin antibodies in sera of Japanese patients with systemic lupus erythematosus*. Clin Exp Immunol, 2004. **136**(3): p. 585-90.
92. Sumiya, M., et al., *Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children*. Lancet, 1991. **337**(8757): p. 1569-70.
93. Lipscombe, R.J., et al., *High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene*. Hum Mol Genet, 1992. **1**(9): p. 709-15.
94. Madsen, H.O., et al., *A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein*. Immunogenetics, 1994. **40**(1): p. 37-44.
95. Garred, P., et al., *Mannose-binding lectin deficiency--revisited*. Mol Immunol, 2003. **40**(2-4): p. 73-84.
96. Madsen, H.O., et al., *Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein*. J Immunol, 1995. **155**(6): p. 3013-20.
97. Madsen, H.O., et al., *Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America*. J Immunol, 1998. **161**(6): p. 3169-75.
98. Bouwman, L.H., B.O. Roep, and A. Roos, *Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity*. Hum Immunol, 2006. **67**(4-5): p. 247-56.
99. Davies, E.J., et al., *Mannose-binding protein gene polymorphism in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(1): p. 110-4.
100. Davies, E.J., et al., *Mannose-binding protein gene polymorphism in South African systemic lupus erythematosus*. Br J Rheumatol, 1998. **37**(4): p. 465-6.
101. Sullivan, K.E., et al., *Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(12): p. 2046-51.
102. Garred, P., et al., *Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients*. Genes Immun, 2001. **2**(8): p. 442-50.
103. Font, J., et al., *Association of mannose-binding lectin gene polymorphisms with antiphospholipid syndrome, cardiovascular disease and chronic damage in patients with systemic lupus erythematosus*. Rheumatology (Oxford), 2006.
104. Ohlenschlaeger, T., et al., *Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2004. **351**(3): p. 260-7.
105. Garcia-Laorden, M.I., et al., *Mannose binding lectin polymorphisms as a disease-modulating factor in women with systemic lupus erythematosus from Canary Islands, Spain*. J Rheumatol, 2003. **30**(4): p. 740-6.
106. Bertoli, A.M., et al., *Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort: XXXVI. Influence of mannose-binding lectin exon 1 polymorphisms in disease manifestations, course, and outcome*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(5): p. 1703-4.
107. Piao, W., et al., *Mannose-binding lectin is a disease-modifying factor in North American patients with systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 2007. **34**(7): p. 1506-13.
108. Jakab, L., et al., *Association between early onset and organ manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE) and a down-regulating promoter polymorphism in the MBL2 gene*. Clin Immunol, 2007. **125**(3): p. 230-6.

109. Seelen, M.A., et al., *Autoantibodies against mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus*. Clin Exp Immunol, 2003. **134**(2): p. 335-43.
110. Mok, M.Y., et al., *Antibodies to mannose binding lectin in patients with systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2004. **13**(7): p. 522-8.
111. Hochberg, M.C., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(9): p. 1725.
112. Shoenfeld Y, Szyper-Kravitz M, Witte T, Doria A, Tsutsumi A, Tatsuya A, et al. *Autoantibodies against protective molecules--C1q, C-reactive protein, serum amyloid P, mannose-binding lectin, and apolipoprotein A1: prevalence in systemic lupus erythematosus*. Ann N Y Acad Sci. 2007 Jun;1108:227-39.

5 ARTIGO CIÊNTÍFICO

PAPER

THE ROLE OF MANNOSE-BINDING LECTIN GENE POLYMORPHISMS AND SMOKING ON DISEASE ACTIVITY AND DAMAGE INDEXES IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS PATIENTS

Guilherme Gischkow Rucatti¹; Odirlei André Monticielo^{1,2}; José Artur Bogo Chies³; Nadine Glesse³, João Carlos Tavares Brenol¹; Ricardo Machado Xavier¹.

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

²Department of Internal Medicine, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil(2).

³Laboratory of Immunogenetics, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author:

Ricardo Machado Xavier

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

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

Telephone/Fax: 55 51 33313834

E-mail: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by multiple autoantibody production, with cellular nuclear components as the most notable targets. With an unknown etiology, it involves genetic, immunological, hormonal and environmental factors. Deficiencies in the mannose-binding lectin (MBL), a component of the complement system, can produce an abnormal presentation of antigens to the immune system. Genetic polymorphisms in the promoter and coding regions of the *MBL2* gene are strongly correlated to serum levels of the MBL protein, with possible impact in the immunological tolerance mechanism. The influence of smoking has not been evaluated in patients who present these allelic variants. Our aim was to investigate the role of MBL haplotypes (divided as deficient, low and high serum level-associated haplotypes) and smoking habit on disease activity and damage indexes in SLE patients. We investigated the frequencies of haplotype variants in 327 European and African-descendants SLE patients. Smoking habits, clinical and laboratory data were revised from clinical charts and genotyping of the promoter and exon 1 variants of *MBL2* were performed by PCR-SSP and PCR-RFLP, respectively. SLICC and SLEDAI score were analyzed comparing the haplotype, smoking habits and pack-years (PY) of smoking using Kruskal-Wallis test for quantitative variables and chi-square test with Bonferroni for other analysis. The study was approved by the local ethical committee. When comparing ever smokers vs. never smokers, we found a lack of association between SLICC and SLEDAI among smoking habit, PY and MBL haplotypes. Further subanalysis on SLE manifestations showed a higher frequency of serositis ($p=0.025$), pericarditis ($p=0.015$), convulsion ($p=0.011$) and presence of anti-Sm ($p=0.016$) on never smokers. Among ever smokers, a significant association was observed between immunologic disorders ($p=0.032$) and anti-RNP ($p=0.013$) in patients who smoke 4 – 24.7 PY, compared with less than 4 or more than 24.7 PY. When stratified by ethnicity and MBL haplotypes, European-descendants with deficient MBL haplotype showed a higher frequency of lupus anticoagulant in smokers ($p=0.001$) and pleuritis ($p=0.016$) among never smokers. On low MBL haplotype, we found a positive association between pericarditis and never smokers ($p=0.027$). Among high MBL haplotype we identified a smaller frequency of neurologic ($p=0.05$) and immunologic disorders ($p=0.027$) and presence of anti-Sm ($p=0.035$) in never

smokers. In relation to African-descendants with low MBL haplotype, a significant association between anti-RNP ($p=0.017$) and never smokers was observed. Those with high MBL haplotype had small association between false positive VDRL and never smokers ($p=0.048$). However, by adjusting the p -value for Bonferroni correction, all these associations lost significance. Our findings presented no evidence that smoking may act as a modulator of disease activity and damage indexes on SLE patients associated to serum MBL haplotypes.

Key-words: Mannose-Binding Lectin, Systemic Lupus Erythematosus, Polymorphism, Smoking, Complement System.

INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease involving chronic inflammatory of multiple organ systems. It is characterized by the production of antibodies and auto-reactive formation of immune complexes. It is a disease affecting primarily women of reproductive age. It is a very heterogeneous disorder in terms of presentation, course and outcome, although it has fairly well defined phenotypes [1-3].

The immune system is a complex and efficient system of defense against harmful internal and external agents, maintaining our homeostasis. The mucosal surfaces are in direct contact with the external environment and are a major site of antigenic and toxic exposure in smokers. It has been reported that tobacco smoke contains more than 5,000 toxic chemicals [4], many carcinogens [5], as well as the potent immuno-modulator, lipopolysaccharide (LPS) and nicotine, [6], compromising both humoral immune and cell-mediated immune responses [7-11].

Exposure to tobacco smoke has been associated with several autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis and SLE [12, 13]. A recent meta-analysis assessing the relationship between SLE susceptibility and smoking provided evidence that current smokers have an increased risk of developing SLE than never or former smokers [13]. Despite the cause of SLE autoantibody formation remains unknown a deficiency in the clearance of this autoantibody could be one of the mechanisms involved on LES pathogenesis and some studies have shown a possible role of mannose-binding lectin (MBL) in physiopathology of SLE [14-16].

The MBL has been suggested to be an important protein of the innate immune system. It primarily recognizes and binds to a specific sugar group on the surface of microorganisms. It has a molecular structure similar to the C1q from the complement system (CS), being the main factor responsible for activation of the lectin pathway of the CS through interaction with MBL-associated serine proteinases (MASPs). It is also recognized to play a role in the modulation of inflammation, probably through cytokine release from monocytes and CS components [17]. Together, CS and MBL are responsible for destruction of microorganisms, apoptotic cell and immune complexes clearance.

Some polymorphic variants of *MBL2* gene are associated with well-characterized haplotypes correlating with circulating levels and functional activity of MBL protein [18, 19]. These single-nucleotide polymorphisms (SNPs) are in strong linkage disequilibrium resulting in seven widespread haplotypes namely: HYP A, LYQA, LYPA, LXPA, HYPD, LYPB and LYQC [20]. This secretor haplotype blocks have been well established to be associated with high, low and deficient MBL serum levels that have been shown to have functional consequences in inborn immunity [21].

Variations in MBL serum levels are thought to influence the susceptibility and the course of different types of cardiovascular and autoimmune diseases. In a previous work, we found in our population that SLE patients showed approximately 3-fold higher odds ratio of developing SLE when they had the presence of one of this SNPs. The presence of this allele was associated with predisposition to SLE and related to clinical and laboratory findings typical of the disease [22].

The serum levels of this protein are under control of these variants but recently cigarette smoke has proved to be capable of influencing its levels [23]. In this context, smoking habit could be creating an immunomodulation for the serum levels of MBL, supporting or interfering in the clearance of immune complexes. In addition, it has been shown that MBL is an acute phase reactant [24], increasing from 1.5 to threefold during the acute phase [25]. Because MBL plasma levels have been reported to increase during infectious and inflammatory processes, it was thought that smoking, a habit that causes systemic inflammation, may have an effect on the circulating MBL levels, modulating disease activity and damage index of SLE patients.

In SLE, few studies related interaction between genetic-environment susceptibility, such as tobacco exposure. Since the smoking status may influence MBL plasma levels, this study aims to evaluate the relationship between MBL secretor haplotype and smoking habits in patients diagnosed with SLE, seeking a possible association between disease activity and severity.

PATIENTS AND METHODS

Study population

This study was performed with on 327 SLE patients, of whom 247 (75.5%) were identified as European-descendants and 76 (24.5%) were characterized as African-descendants. The ethnic classification used by our group (based on phenotypic characteristics of individuals and ethnicity data of parents/grandparents reported by the participants reported by the participants at the time of blood collection) is widely adopted in our country. However, we must admit that individuals classified as European-descendants or African-descendants can present a certain degree of admixture. A recent study by Santos et al., which assessed individual interethnic admixture using a 48-insertion-deletion Ancestry-Informative Marker panel, identified a very high level of European contribution (94%) and far fewer Native American (5%) and African (1%) genes in a sample of 81 European-descendants individuals from southern Brazil (70). Therefore, the subgrouping of the studied individuals according to the criteria employed in the present work seems to reflect the actual ethnic/genetic background of this human population. The patients were recruited from the outpatient clinic of the Division of Rheumatology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All patients fulfilled the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of SLE [3]. Medical records and study protocol were reviewed for demographic, self-reported smoking habit, clinical and laboratory data. These data are routinely obtained in a standardized way in this cohort of patients. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and informed consent according to the Declaration of Helsinki was obtained from all patients.

Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI)[1] and Systemic Lupus International Collaborative Clinics/American College of Rheumatology (SLICC)[2] were performed for each patient at the same time that smoking information was obtained. Other clinical and laboratory features evaluated were: presence or absence of malar rash, discoid rash, photosensitivity, oral or nasal ulcers, serositis, arthritis, nephritis, neurological manifestations (psychosis and convulsions), hematologic events (hemolytic anemia, leukopenia, lymphopenia and thrombocytopenia), immunological events (rheumatoid arthritis, scleroderma, dermatomyositis, thyroiditis) positive antinuclear antibodies (ANAs) (titer >1:100) and

other auto-antibodies (anti-double-stranded DNA, anti-Sm, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anti-RNP, anticardiolipin, lupus anticoagulant and false positive VDRL). The definition of each variable followed the description from the classification criteria for SLE [3]. Furthermore, patients were evaluated for the presence of Sjögren's syndrome and secondary antiphospholipid syndrome, according to the classification criteria proposed for both [28, 29].

Registration of the smoking habits

Smoking habit was inquired by a physician at the time of blood collection for genomic DNA extraction. Current smokers and those who had quit smoking were combined and designated as ever smokers. Ever and never smokers were distinguished in both populations according to the criteria described [30] based on previously determined epidemiological thresholds [31, 32]. Only cigarette users were considered as smokers in the analysis.

We selected one binary and one continuous smoking habit for analysis. The binary measure was ever versus never smoking and continuous pack-years (PY). Age at initiation was defined as the age when a subject started smoking regularly for six months or longer. Current and former smokers were asked to provide information on the number of cigarettes they smoked per day. Former smokers reported the number of cigarettes smoked per day before quitting. PY was derived by converting cigarettes per day to packs per day (CPD/20) and multiplying this amount by duration. For the PY analysis, ever group were classified into categories (CAT) using the 25th and 75th percentile of PY values of the European-derived as the cut points: CAT1 0.1 to < 4 pack-years, CAT2 4 – 24.7 pack-years, and > 24.7 pack-years [33]. We excluded those participants without smoking habit or who had smoked but did not provide their age at smoking initiation.

Preparation of genomic DNA and molecular characterization of promoter and exon 1 polymorphisms

Total genomic DNA was extracted from 5 mL peripheral blood samples, collected with EDTA, and purified through salting-out method [34]. DNA samples were stored at -20°C. Seven SNPs located within the secretor haplotype region of the *MBL-2* gene were genotyped. The promoter regions spanning the -550 (L or H) and -

221 (X or Y) polymorphisms were amplified by Polymerase Chain Reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP) as described by Neonato *et al.* [35], using the following primers: L forward: 5'-GCTTACCCAGGCAAGCCTGTC-3', X reverse: 5'-GGAAGACTATAAACATGCTTTTCG-3', H forward: 5'-GCTTACCCAGGCAAGCCTGTG-3' and Y reverse: 5'-GGAAGACTATAAACATGCTTTCC-3'. Four simultaneous reactions were made for each sample, using different combinations of primers (LX, LY, HX and HY) to identify the haplotypes. The amplified fragments were visualized in 2% agarose gel. In addition, a control gene (cytochrome P450 debrisoquine 4-hydroxylase, *CYP2D6*) was amplified in every reaction with specific primers: D6M2: 5'-TCGCCCTGCAGAGACTCCTC-3' and D6B5: 5'-TGCCGCCTTCGCCAACCCT-3'. MBL Exon 1 genotyping was performed as previously described [22, 36]. Altogether, the presence of any B, C or D allele from Exon 1 has been collectively labeled as O, whereas the simultaneous absence of variants at the three codons has been called as allele A.

Combined genotypes were constructed and designated based on the haplotypes reported in the literature determining MBL as: LXA/O, O/O for deficient, LXA/LXA, HYA/O and LYA/O for low-producers and HYA/A, LYA/A, indicating high-producers [20, 37, 38].

Statistical analysis

MBL2 genotype frequencies were tabulated by direct counting and allele frequencies were calculated from the observed number of genotypes. Chi-square analyses were used for each individual SNPs to test for deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium. SLICC and SLEDAI disease score were analyzed comparing ever versus never smokers frequency regarding smoking habit, PY categories and MBL production by Kruskal-Wallis test for quantitative variables. Disease feature were analyzed in the same way by Chi-square or Fisher's two-tailed exact tests when necessary, using Bonferroni correction for all the multiple comparisons. All analyses were conducted using SPSS software version 15.0 and WinPepi 10.0. All *P* values were based on 2-sided tests and were considered statistically significant at $P \leq 0.05$.

RESULTS

We investigated the relationship between MBL secretor haplotype and smoking status on SLE among 250 European-descendants and 77 African-descendants patients. The relevant demographic and smoking features are given in Table 1. Three hundred patients (91.7%) were female and 27 (8.3%) were male. Mean age (\pm SD) was 42.2 ± 14.3 years and the mean disease diagnostic age was 32.7 ± 13.6 years. Among European-descendants 44 (17.8%) were current smokers, 59 (23.9%) former and 144 (58.3%) never smokers. In African-descendants 18 (23.7%) were current, 22 (28.9%) former and 36 (47.4%) never smokers. Combining smokers and former smokers from both ethnicity we formed the ever smoker group 143 (44.4%). Among European-descendants ever smokers 23 (26.4%) smoke less than 4 PY, 41 (47.1%) 4-24.7 PY and 23 (26.4%) > 24.7 PY. In African-descendants ever smokers 11 (29.7%) smoke < 4 PY, 20 (54.1%) use 4-24.7 PY and 6 (16.2%) > 24.7 PY.

Clinical, laboratory and demographic features observed in SLE patients were described and compared among different ethnic groups in earlier work [22]. Analysis on SLICC and SLEDAI scores showed no statistical differences between smoking status and PY. Regarding other clinical and laboratorial features of the disease in relation to smoking status, never smokers were statistically associated with serositis ($p= 0.025$), pericarditis ($p= 0.015$), neurological events ($p=0.003$), especially convulsion ($p= 0.011$) and anti-Sm ($p= 0.016$) when compared to ever smokers. Among PY categories, we found a higher incidence of immunological events ($p=0.032$) and anti-RNP ($p=0.013$) in those smokers in CAT2 while Sjögren ($p=0.023$) was statistically associated with CAT1 (Table 2).

In terms of MBL polymorphisms, variant alleles R52H and IVSnt5 were not found in our population, as previously reported [22]. The genotypic distribution of all polymorphisms was in Hardy–Weinberg equilibrium, and haplotype frequencies of *MBL2* genotyping are show in Table 3. Among 250 European-descendants, 54 (21.7%) have a deficient MBL haplotype, 74 (29.7%) low and 121 (48.6%) have a haplotype for high serum MBL. In African-descendants, 13 (17.1%) were deficient, 19 (25%) low and 44 (57.9%) had high MBL secretor haplotype.

When stratified by ethnicity and MBL haplotypes, SLICC and SLEDAI from patients reached no statistical difference between scores in both European and African-descendants. However further subanalysis on clinical and laboratorial

manifestations of the disease shows some differences. Among European-descendants with deficient MBL haplotype (Table 4), it was observed a higher frequency of lupus anticoagulant in ever smokers ($p=0.001$) and pleuritis ($p=0.016$) in never smokers. On low MBL haplotype, we found a positive association between pericarditis and never smokers ($p=0.027$). Among high MBL haplotype we identified a smaller frequency of neurological ($p=0.05$) and immunological disorders ($p=0.027$) and presence of anti-Sm ($p=0.035$) in never smokers. In relation to African-descendants with low MBL haplotype more cases were observed between anti-RNP and never smokers (0% vs. 58.3%, $p=0.017$). Regarding the high MBL haplotype, we found a small association between false positive VDRL with never smokers (0% vs. 13.3%, $p=0.048$) (data not shown). However, all these associations lost significance when the p -value was adjusted for Bonferroni correction.

DISCUSSION

The present study is, to our knowledge, the first to investigate a possible association between MBL secretory haplotypes and smoking habit on disease activity and damage indexes of SLE patients. This research on the interaction between genes and cigarette exposure may give us a better understanding of cellular and molecular mechanisms on SLE disease providing a hypothesis on how cigarette smoking may exercise some influence over clinical and laboratorial manifestation.

We analyzed the clinical differences between patients with SLE according to the MBL haplotype combinations and smoking habit. Our findings are, somehow, surprisingly when we see so many associations with the disease manifestations in never smokers. SLICC and SLEDAI scores did not significantly differ between smoking habit and PY. These findings are distinct compared to Ghaussy *et al*, who investigated the impact of smoking on SLE disease activity and damage estimated by the SLEDAI and SLICC, respectively [39]. The authors observed that current smokers presented a distinguished higher disease activity than former or never smokers. They also found a tendency for more severe disease in terms of SLICC despite the difference among smokers and never smokers was not statistically significant.

In smoking intensity we found a positive association between smoking and PY categories. Patients that smoked 4-27 PY were associated to immunologic disorders and presence of anti-RNP. In those who smoked less than 4 PY we observed a

higher frequency of Sjögren syndrome. In concordance to these findings, high amounts of cigarette exposure are associated with immunological disorders as rheumatoid arthritis (RA) and systemic sclerosis [40-42]. In another study comparing smoking and the risk of RA, the authors report a relative risk of RA of 1.5 (95% CI 1.0-2.0) for women who had smoked 20 or more PY [43] and in agreement Pérez-de-Lis *et al.* show that patients with primary SS have a lower frequency of smoking (19% versus 31%, $p < 0.001$) compared to higher smoking [44]

Although no significant correlation between disease activity and damage indexes in MBL haplotype associated with smoking status was seen, smoking and MBL haplotypes were associated with some disease manifestations. Comparing ever versus never smokers a statistically significant difference was observed between serositis ($p=0.025$), pericardites ($p=0.015$) and presence of anti-SM among never smokers. Neurological disorders such convulsion ($p=0.011$) was also related in those patients. Differing from our finding, a study relating anti-dsDNA and smoking, evaluated 410 SLE patients showing that smoking is associated with dsDNA autoantibody production in white SLE patients that were current but not former or never smokers. They suggest that temporal proximity seem to be related to the effect of smoking on dsDNA antibody status [45]. In contrast to these findings, the presence of anti-dsDNA soropositivity was not associated with smoking status in our sample. Apparently by combining of current and former smokers we lost the temporal proximity between these two variables precluding a comparison.

Biological plausibility is difficult to clarify because the mechanisms around how smoking could influence the immune system, leading to an increase production of SLE manifestations, remain unknown. Even more, why never smokers seem to have a higher frequency of SLE manifestations than current and former smokers together? May be these bait related to the actual serum levels of nicotine or MBL? Moreover, the question of whether or not our findings constitute a genuine, casual relation has not been resolved. Some studies discuss that tobacco smoke should be avoided by SLE patients, although other studies have speculated about a beneficial effect [46, 47]. Whereas none of our finding has been previously described on the literature, we attempt to speculate on the biological mechanisms underlying the finding presented.

Nicotine is known for its immunosuppressive and anti-inflammatory qualities [48-51]. Some of the inhibitory effects of nicotine have been attributed to its effect on the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor found in macrophages, T-cells and B cells [49,

52]. It seems that nicotine is capable to reduce production of some pro-inflammatory cytokines such TNF- α , IL-1 and IL-6 [49, 52], impairs antigen mediated signal transduction in lymphocytes [53] and induces a state of anergy in T cells [54]. Thus, nicotine may be contributing to the immunosuppressive and anti-inflammatory properties of cigarette smoke [55]. Further, in a publication from 2007, the authors discuss the possibility that high doses of nicotine intake may cause an anti-inflammatory effect over erosive process in RA [56]. Since RA and SLE are both inflammatory joint disease, these findings are pertinent to SLE.

Furthermore, some reports show an expansion on total number of circulating T-lymphocytes on cigarette smokers [9]. Studies show a an increase in CD8⁺ cells (T-suppressor) with a reduction in CD4⁺ cells (T-helper) and impaired their function with a subsequent decrease in the CD4⁺/CD8⁺ balance in heavy smokers (more than 50 PY) [57]. In contrast, light smokers have an increase in leukocyte count with a selective increase in CD4⁺ cells, resulting in a significant increase in the CD4⁺/CD8⁺ balance [58]. Studies on bronchoalveolar lavage have demonstrated a marked decrease in the percentage and absolute number of CD4⁺ cells with an increase in CD8⁺ cells in moderate smokers (average 14 PY), suggesting that circulatory lymphocyte populations follow alveolar changes [59]. Whereas no specific mechanism has been directly linked to any of the autoimmune illnesses, it is complicated the full understanding of the smoking effect [42].

When MBL haplotypes were examined in relation to smoking habit and ethnicity, a small predominance of SLE manifestations was observed among high serum MBL in European-descendants. These data contrast with same papers which reported that high levels of MBL would be more related to inflammatory process due to a stronger CS activation and release of pro-inflammatory cytokines [60-63]. But when we observed the smoking status, one sees that never smokers are associated to disease manifestations and the same was observed among deficient and low serum MBL haplotype. In this situation it seems that smoking cigarette have two main effects over the SLE features. It could be generating an immune suppression by decreasing the levels of inflammatory cytokines and antibody through nicotine leading to "protective effect" in smokers with a deficient MBL haplotype but on the other hand, cigarette could be increasing the circulating levels of MBL [23] rising disease manifestations among smokers with high levels of MBL.

There are several studies that reported association between SLE with different clinical and laboratory features of disease and MBL polymorphisms [64-66]. A positive association was observed between 0/0 genotype to deficient serum MBL and the development of arterial thrombosis in SLE patients [67]. Also, patients carrying genotypes related to low MBL levels presented a higher prevalence of chronic renal failure, vasculitis, cardiac valve dysfunction, associated APS and a higher mean SLICC score [65], while MBL deficient SLE patients had more renal involvement, increased infection, strongly increased risk for arterial thrombosis and increased levels of autoantibodies against molecules associated with apoptotic cells, such as C1q and cardiolipin [68]. However studies involving SLE manifestations and MBL are still very contradictory since the allelic frequencies are different among ethnic groups and one must be cautious in extrapolating results to other populations.

A limitation of the present study is that although it comprised 327 SLE patients, some of the findings were based on low number of cases. Unfortunately, among African-descendants due to the small number of study participants in these strata, this analysis was not possible, thus requiring a larger future study. Therefore, we cannot exclude the possibility that insufficient sample size after stratification may explain the absence of clinical and laboratorial manifestation between smokers and low levels of MBL as described in others studies [22, 39, 45, 69].

In the future, interpretation of prior studies on the association of cigarette smoking with SLE may be complicated by patients' use of medications that can influence disease. Also, the pharmacokinetics of many drugs can be affected by simultaneous cigarette smoke intake [46]. To examine this possibility, it would be ideal to control those patients under immunosuppression therapy at the time of diagnosis before treatment was initiated, in order to afford better comparison. Evaluating of cotinine, the major metabolite of nicotine and the concrete value of serum MBL protein must be analyzed to clarify the real contribution of these factors to SLE disease.

In summary, the present work shows no association between smoking, PY and serum MBL haplotype with disease activity and damage estimated by the SLEDAI and SLICC, respectively. Our findings presented no evidence that smoking may act as a modulator of the clinical and laboratory feature of SLE associated with the MBL protein.

Tables

Table 1. Distribution of selected clinical characteristics for SLE patients

Characteristics	Whole (327)	European-descendants (247)	African-descendants (77)
Sex, No. (%)			
Female	300 (91.7)		
Age, y	42.2±14.3		
Age at disease diagnostic, y	32.7±13.6		
Smoking statuts, No (%) □			
Never	180 (55.7)	144 (58.3)	36 (47.4)
Former	81 (25.1)	59 (23.9)	22 (28.9)
Current	62 (19.2)	44 (17.8)	18 (23.7)
Pack-years □			
< 4 (< 25th percentile)	34 (27.4)	23 (26.4)	11 (29.7)
4 – 24.7 (25th – 75th percentile)	61 (49.2)	41 (47.1)	20 (54.1)
> 24.7 (> 75th percentile)	29 (23.4)	23 (26.4)	6 (16.2)

□ Patientes with missing data were not included:

□ Smoking level was categorized by using the 25th and 75th percentile pack-year values from current and former **European-descendants** patients.

Table 2. Association between smoking habit and SLE disease indexes and manifestations

Disease Indexes ‡	Smoking habit			Pack-years			
	Ever (143)	Never (180)	<i>P</i> -value	CAT1 (34)	CAT2 (61)	CAT3 (29)	<i>P</i> -value
SLEDAI	2 (0 - 36)	1 (0 - 16)	0.553	1 (0 - 36)	0 (0- 20)	2 (0 - 11)	0.67
SLICC	1 (0 - 7)	1 (0 - 6)	0.59	1 (0 - 5)	1 (0 - 7)	1 (0 - 5)	0.558
Features, No. (%)							
Malar rash	80 (55.9)	90 (55)	0.865	21 (61.8)	39 (63.9)	13 (44.8)	0.201
Discoid rash	21 (14.7)	26 (14.4)	0.951	7 (20.6)	7 (11.5)	5 (17.2)	0.471
Photosensitivity	112 (78.3)	134 (74.4)	0.417	27 (79.4)	52 (85.2)	22 (75.9)	0.529
Oral ulcers	46 (32.2)	73 (40.6)	0.121	12 (35.3)	18 (29.5)	8 (27.6)	0.775
Arthritis	119 (83.2)	154 (85.6)	0.564	31 (91.2)	50 (82)	25 (86.2)	0.47
Serositis	36 (25.2)	66 (36.9)	0.025	5 (14.7)	19 (31.1)	7 (24.1)	0.206
Pleuritis	30 (21)	54 (30.2)	0.062	5 (14.7)	15 (24.6)	5 (17.2)	0.466
Pericarditis	14 (9.8)	35 (19.6)	0.015	1 (2.9)	9 (14.8)	3 (10.3)	0.197
Nephritis	58 (40.6)	87 (48.3)	0.163	15 (44.1)	28 (45.9)	7 (24.1)	0.126
Neurological disorders	9 (6.3)	31 (17.2)	0.003	2 (5.9)	6 (9.8)	1 (3.4)	0.516
Convulsion	4 (2.8)	18 (10)	0.011	1 (2.9)	3 (4.9)	0 (0)	0.464
Hematological disorders	109 (76.2)	146 (81.1)	0.285	28 (82.4)	46 (75.4)	22 (75.9)	0.721
Immunologic disorders	98 (69)	129 (72.1)	0.551	29 (85.3)	42 (68.9)	16 (55.2)	0.032
Anti-DNA	72 (50.7)	88 (49.2)	0.784	23 (67.6)	31 (50.8)	11 (37.9)	0.059
Anti-Sm	20 (14.2)	45 (25.1)	0.016	3 (8.8)	10 (16.7)	4 (13.8)	0.571
Anticardiolipina IgG/ IgM	41 (29.1)	50 (27.9)	0.822	15 (44.1)	16 (26.7)	7 (24.1)	0.142
Lupus Anticoagulant	14 (9.9)	10 (5.6)	0.148	3 (8.8)	7 (11.5)	2 (6.9)	0.775
False positive VDRL	4 (2.8)	11 (6.1)	0.161	1 (2.9)	3 (4.9)	0 (0)	0.464
Anti-RNP	34 (25.8)	58 (34.9)	0.088	3 (9.7)	22 (37.3)	6 (20.7)	0.013
Sjögren	11 (7.9)	18 (10.1)	0.498	6 (17.6)	2 (3.3)	1 (3.4)	0.023
APS	11 (7.9)	9 (5)	0.301	5 (14.7)	3 (4.9)	2 (6.9)	0.236

Patients with missing data were not included. Abbreviations: SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; SLICC: systemic lupus international collaborating clinics; VDRL: venereal disease research laboratory test; APS: antiphospholipid syndrome. CAT1 < 25th percentile, CAT2 25th – 75th percentile, CAT3 > 75th percentile of PY from Ever group. Ever group includes current and former smokers. ‡Median (minimum - maximum).

Table 3. Distribution of *MBL2* secretory haplotype in SLE patients

	Whole (325)	European-descendants (249)	African-descendants (76)
Haplotype, No. (%)‡			
Deficient levels	67 (20.6)	54 (21.7)	13 (17.1)
Low levels	93 (28.6)	74 (29.7)	19 (25)
High levels	165 (50.8)	121(48.6)	44 (57.9)

Patients with missing data were not included. ‡ *MBL2* secretory haplotypes were categorized according to the haplotype associated to deficient (LXA/0, 0/0), low (LXA/LXA, HYA/0 and LYA/0) and high serum levels (LYA/A, HYA/A).

Table 4. Association between *MBL2* secretory haplotype and smoking habit with disease indexes and manifestations of European-descendants SLE patients

Disease Indexes‡	Deficient <i>MBL</i> (54)			Low <i>MBL</i> (74)			High <i>MBL</i> (121)		
	Ever	Never	<i>p</i> -value	Ever	Never	<i>p</i> -value	Ever	Never	<i>p</i> -value
SLEDAI	2 (0 - 36)	1 (0 - 16)	0.968	1 (0 - 36)	0 (0 - 20)	0.947	2 (0 - 11)	2 (0 - 16)	0.536
SLICC	1 (0 - 7)	1 (0 - 6)	0.481	1 (0 - 5)	1 (0 - 4)	0.848	1 (0 - 5)	1 (0 - 2)	0.984
Features, No. (%)									
Malar rash	13 (56.5)	16 (51.6)	0.787	14 (60.9)	25 (50)	0.454	32 (56.1)	38 (61.3)	0.582
Discoid rash	5 (21.7)	3 (9.7)	0.264	4 (17.4)	11 (22)	0.762	8 (14)	6 (9.7)	0.573
Photosensitivity	18 (78.3)	22 (71)	0.755	19 (82.6)	40 (80)	1	49 (86)	50 (80.6)	0.472
Oral ulcers	8 (34.8)	10 (32.3)	0.846	9 (39.1)	21 (42)	0.817	16 (28.1)	28 (45.2)	0.054
Arthritis	19 (82.6)	27 (87.1)	0.711	19 (82.6)	43 (86)	0.733	47 (82.5)	52 (83.9)	0.837
Serositis	3 (13)	12 (38.7)	0.064	7 (30.4)	20 (40.8)	0.444	14 (24.6)	17 (27.4)	0.835
Pleuritis	1 (4.3)	10 (32.3)	0.016	7 (30.4)	17 (34.7)	0.794	12 (21.1)	14 (26.6)	0.84
Pericarditis	3 (13)	7 (26.6)	0.489	1 (4.3)	14 (28.6)	0.027	4 (7)	6 (9.7)	0.745
Nephritis	6 (26.1)	12 (38.7)	0.392	10 (43.5)	25 (50)	0.625	26 (45.6)	29 (46.8)	0.899
Neurological disorders	3 (13)	7 (22.6)	0.489	3 (13)	7 (14)	1	1 (1.8)	11 (17.7)	0.05
Convulsion	2 (8.7)	5 (16.1)	0.685	0 (0)	3 (6)	0.547	1 (1.8)	7 (11.3)	0.63
Hematological disorders	20 (87)	27 (87.1)	1	16 (69.6)	40 (80)	0.378	38 (66.7)	48 (77.4)	0.222
Immunologic disorders	15 (65.2)	19 (61.3)	0.785	19 (82.6)	36 (73.5)	0.554	33 (58.9)	49 (79)	0.027
Anti-DNA	11 (47.8)	12 (38.7)	0.583	11 (47.8)	25 (51)	0.8	29 (51.8)	32 (51.6)	0.985
Anti-Sm	3 (12)	6 (19.4)	0.717	6 (26.1)	9 (18.4)	0.537	6 (10.7)	17 (27.4)	0.035
Anticardiolipina IgG/ IgM	6 (26.1)	9 (29)	0.811	10 (43.5)	16 (32.7)	0.435	12 (21.4)	16 (25.8)	0.667
Lupus Anticoagulant	8 (34.8)	0 (0)	0.0001	1 (4.3)	5 (10.2)	0.402	2 (3.6)	5 (8.1)	0.302
False positive VDRL	1 (4.3)	1 (3.2)	0.829	2 (8.7)	5 (10.2)	0.84	1 (1.8)	3 (4.8)	0.36
Anti-RNP	7 (30.4)	10 (33.3)	0.823	8 (42.1)	12 (28.6)	0.38	11 (20.8)	19 (33.3)	0.198
Sjögren	0 (0)	1 (3.2)	1	3 (13.6)	6 (12.2)	1	6 (10.9)	9 (14.5)	0.593
APS	2 (8.7)	0 (0)	0.177	2 (9.1)	5 (10.2)	1	4 (7.3)	3 (4.8)	0.705

Patients with missing data were not included Abbreviations: SLEDAI: systemic lupus erythematosus disease activity index; SLICC: systemic lupus international collaborating clinics; VDRL: venereal disease research laboratory test; APS: antiphospholipid syndrome. Haplotype associated to deficient (LXA/0, 0/0), low (LXA/LXA, LYA/0, HYA/0) and high serum levels (LYA/A, HYA/A). Ever group includes current and former smokers. ‡Median (minimum - maximum).

REFERENCES

1. Bombardier, C., et al., *Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE.* Arthritis Rheum, 1992. **35**(6): p. 630-40.
2. Gladman, D., et al., *The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 1996. **39**(3): p. 363-9.
3. Hochberg, M.C., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 1997. **40**(9): p. 1725.
4. Arnson, Y., Y. Shoenfeld, and H. Amital, *Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity.* J Autoimmun, 2010. **34**(3): p. J258-65.
5. Smith, C.J., S.D. Livingston, and D.J. Doolittle, *An international literature survey of "IARC Group I carcinogens" reported in mainstream cigarette smoke.* Food Chem Toxicol, 1997. **35**(10-11): p. 1107-30.
6. Cerny, E.H., et al., *Preclinical development of a vaccine 'against smoking'.* Onkologie, 2002. **25**(5): p. 406-11.
7. Mehta, H., K. Nazzal, and R.T. Sadikot, *Cigarette smoking and innate immunity.* Inflamm Res, 2008. **57**(11): p. 497-503.
8. Corberand, J., et al., *Effect of tobacco smoking on the functions of polymorphonuclear leukocytes.* Infect Immun, 1979. **23**(3): p. 577-81.
9. Tanigawa, T., et al., *Increase in memory (CD4+CD29+ and CD4+CD45RO+) T and naive (CD4+CD45RA+) T-cell subpopulations in smokers.* Arch Environ Health, 1998. **53**(6): p. 378-83.
10. Takeuchi, M., et al., *Inhibition of lung natural killer cell activity by smoking: the role of alveolar macrophages.* Respiration, 2001. **68**(3): p. 262-7.
11. Vassallo, R., et al., *Cigarette smoke extract suppresses human dendritic cell function leading to preferential induction of Th-2 priming.* J Immunol, 2005. **175**(4): p. 2684-91.
12. Stolt, P., et al., *Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases.* Ann Rheum Dis, 2003. **62**(9): p. 835-41.
13. Costenbader, K.H., et al., *Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis.* Arthritis Rheum, 2004. **50**(3): p. 849-57.
14. Seelen, M.A., et al., *A role for mannose-binding lectin dysfunction in generation of autoantibodies in systemic lupus erythematosus.* Rheumatology (Oxford), 2005. **44**(1): p. 111-9.
15. Calvo-Alen, J., et al., *Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort: XXXIV. Deficient mannose-binding lectin exon 1 polymorphisms are associated with cerebrovascular but not with other arterial thrombotic events.* Arthritis Rheum, 2006. **54**(6): p. 1940-5.
16. Monticelo, O.A., et al., *The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus.* Clin Rheumatol, 2008. **27**(4): p. 413-9.
17. Dommett, R.M., N. Klein, and M.W. Turner, *Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future.* Tissue Antigens, 2006. **68**(3): p. 193-209.
18. Turner, M.W., *The role of mannose-binding lectin in health and disease.* Mol Immunol, 2003. **40**(7): p. 423-9.

19. Baccarelli, A., et al., *Mannose-binding lectin-2 genetic variation and stomach cancer risk*. Int J Cancer, 2006. **119**(8): p. 1970-5.
20. Madsen, H.O., et al., *Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein*. J Immunol, 1995. **155**(6): p. 3013-20.
21. Garred, P., et al., *Mannose-binding lectin and its genetic variants*. Genes Immun, 2006. **7**(2): p. 85-94.
22. Monticielo, O.A., et al., *Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2010. **19**(3): p. 280-7.
23. Maffei, G., et al., *Plasma levels of mannan-binding lectin in relation to periodontitis and smoking*. J Periodontol, 2005. **76**(11): p. 1881-9.
24. Ezekowitz, R.A., L.E. Day, and G.A. Herman, *A human mannose-binding protein is an acute-phase reactant that shares sequence homology with other vertebrate lectins*. J Exp Med, 1988. **167**(3): p. 1034-46.
25. Thiel, S., et al., *The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response*. Clin Exp Immunol, 1992. **90**(1): p. 31-5.
26. Vargas, A.E., et al., *Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations*. Braz J Med Biol Res, 2006. **39**(3): p. 321-5.
27. Veit, T.D., et al., *Association of the HLA-G 14 bp polymorphism with systemic lupus erythematosus*. Lupus, 2009. **18**(5): p. 424-30.
28. Vitali, C., et al., *Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group*. Ann Rheum Dis, 2002. **61**(6): p. 554-8.
29. Miyakis, S., et al., *International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS)*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(2): p. 295-306.
30. Bergen, A.W., et al., *A genome-wide search for loci contributing to smoking and alcoholism*. Genet Epidemiol, 1999. **17 Suppl 1**: p. S55-60.
31. Anda, R.F., et al., *Depression and the dynamics of smoking. A national perspective*. JAMA, 1990. **264**(12): p. 1541-5.
32. Li, M.D., et al., *A meta-analysis of estimated genetic and environmental effects on smoking behavior in male and female adult twins*. Addiction, 2003. **98**(1): p. 23-31.
33. Caporaso, N., et al., *Genome-wide and candidate gene association study of cigarette smoking behaviors*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4653.
34. Lahiri, D.K. and J.I. Nurnberger, Jr., *A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(19): p. 5444.
35. Neonato, M.G., et al., *Genetic polymorphism of the mannose-binding protein gene in children with sickle cell disease: identification of three new variant alleles and relationship to infections*. Eur J Hum Genet, 1999. **7**(6): p. 679-86.
36. Madsen, H.O., et al., *A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein*. Immunogenetics, 1994. **40**(1): p. 37-44.
37. Madsen, H.O., et al., *Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America*. J Immunol, 1998. **161**(6): p. 3169-75.
38. Pine, S.R., et al., *Lung cancer survival and functional polymorphisms in MBL2, an innate-immunity gene*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(18): p. 1401-9.
39. Ghaussy, N.O., et al., *Cigarette smoking and disease activity in systemic lupus erythematosus*. J Rheumatol, 2003. **30**(6): p. 1215-21.

40. Silman, A.J., J. Newman, and A.J. MacGregor, *Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins.* Arthritis Rheum, 1996. **39**(5): p. 732-5.
41. Hudson, M., et al., *Cigarette smoking in patients with systemic sclerosis.* Arthritis Rheum, 2011. **63**(1): p. 230-8.
42. Harel-Meir, M., Y. Sherer, and Y. Shoenfeld, *Tobacco smoking and autoimmune rheumatic diseases.* Nat Clin Pract Rheumatol, 2007. **3**(12): p. 707-15.
43. Voigt, L.F., et al., *Smoking, obesity, alcohol consumption, and the risk of rheumatoid arthritis.* Epidemiology, 1994. **5**(5): p. 525-32.
44. Perez-De-Lis, M., et al., *Cardiovascular risk factors in primary Sjogren's syndrome: a case-control study in 624 patients.* Lupus, 2010. **19**(8): p. 941-8.
45. Freemer, M.M., T.E. King, Jr., and L.A. Criswell, *Association of smoking with dsDNA autoantibody production in systemic lupus erythematosus.* Ann Rheum Dis, 2006. **65**(5): p. 581-4.
46. Rubin, R.L., et al., *Effect of cigarette smoke on autoimmunity in murine and human systemic lupus erythematosus.* Toxicol Sci, 2005. **87**(1): p. 86-96.
47. Westhoff, G., R. Rau, and A. Zink, *Rheumatoid arthritis patients who smoke have a higher need for DMARDs and feel worse, but they do not have more joint damage than non-smokers of the same serological group.* Rheumatology (Oxford), 2008. **47**(6): p. 849-54.
48. Nizri, E., et al., *Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: A new role for acetylcholinesterase inhibitors.* Neuropharmacology, 2006. **50**(5): p. 540-7.
49. Nizri, E., et al., *Activation of the cholinergic anti-inflammatory system by nicotine attenuates neuroinflammation via suppression of Th1 and Th17 responses.* J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6681-8.
50. Madretsma, S., et al., *In-vivo effect of nicotine on cytokine production by human non-adherent mononuclear cells.* Eur J Gastroenterol Hepatol, 1996. **8**(10): p. 1017-20.
51. Frohlich, M., et al., *Independent association of various smoking characteristics with markers of systemic inflammation in men. Results from a representative sample of the general population (MONICA Augsburg Survey 1994/95).* Eur Heart J, 2003. **24**(14): p. 1365-72.
52. Kalra, R., et al., *Effects of cigarette smoke on immune response: chronic exposure to cigarette smoke impairs antigen-mediated signaling in T cells and depletes IP3-sensitive Ca(2+) stores.* J Pharmacol Exp Ther, 2000. **293**(1): p. 166-71.
53. Geng, Y., et al., *Effects of nicotine on the immune response. I. Chronic exposure to nicotine impairs antigen receptor-mediated signal transduction in lymphocytes.* Toxicol Appl Pharmacol, 1995. **135**(2): p. 268-78.
54. Savage, S.M., et al., *Effects of cigarette smoke on the immune response. II. Chronic exposure to cigarette smoke inhibits surface immunoglobulin-mediated responses in B cells.* Toxicol Appl Pharmacol, 1991. **111**(3): p. 523-9.
55. Ahmed, F.E., *Role of genes, the environment and their interactions in the etiology of inflammatory bowel diseases.* Expert Rev Mol Diagn, 2006. **6**(3): p. 345-63.
56. Finckh, A., et al., *Cigarette smoking and radiographic progression in rheumatoid arthritis.* Ann Rheum Dis, 2007. **66**(8): p. 1066-71.
57. Robbins, C.S., et al., *Cigarette smoke exposure impairs dendritic cell maturation and T cell proliferation in thoracic lymph nodes of mice.* J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6623-8.
58. Tollerud, D.J., et al., *The effects of cigarette smoking on T cell subsets. A population-based survey of healthy caucasians.* Am Rev Respir Dis, 1989. **139**(6): p. 1446-51.

59. Costabel, U., et al., *Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes.* Chest, 1986. **90**(1): p. 39-44.
60. Garred, P., et al., *Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis?* Eur J Immunogenet, 1994. **21**(2): p. 125-31.
61. Olivo-Marston, S.E., et al., *Childhood exposure to secondhand smoke and functional mannose binding lectin polymorphisms are associated with increased lung cancer risk.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(12): p. 3375-83.
62. Matsushita, M., et al., *Single nucleotide polymorphisms of the mannose-binding lectin are associated with susceptibility to primary biliary cirrhosis.* J Autoimmun, 2001. **17**(3): p. 251-7.
63. Walsh, M.C., et al., *Mannose-binding lectin is a regulator of inflammation that accompanies myocardial ischemia and reperfusion injury.* J Immunol, 2005. **175**(1): p. 541-6.
64. Jakab, L., et al., *Association between early onset and organ manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE) and a down-regulating promoter polymorphism in the MBL2 gene.* Clin Immunol, 2007. **125**(3): p. 230-6.
65. Font, J., et al., *Association of mannose-binding lectin gene polymorphisms with antiphospholipid syndrome, cardiovascular disease and chronic damage in patients with systemic lupus erythematosus.* Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(1): p. 76-80.
66. Piao, W., et al., *Mannose-binding lectin is a disease-modifying factor in North American patients with systemic lupus erythematosus.* J Rheumatol, 2007. **34**(7): p. 1506-13.
67. Ohlenschlaeger, T., et al., *Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus.* N Engl J Med, 2004. **351**(3): p. 260-7.
68. Bouwman, L.H., B.O. Roep, and A. Roos, *Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity.* Hum Immunol, 2006. **67**(4-5): p. 247-56.
69. Takahashi, R., et al., *Association of mannose binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus.* Ann Rheum Dis, 2005. **64**(2): p. 311-4.
70. Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Matte C, Hutz MH, Santos SE. *Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel.* Hum Mutat. 2010. **31**(2):184-90.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo não encontrou qualquer relação significativa entre os haplótipos associados à produção de MBL e hábito tabagista nos índices de atividade, cronicidade e dano de pacientes com LES.

Apesar de observarmos algumas diferenças clínicas e laboratoriais associadas a não tabagistas, elas não atingiram valor estatístico significativo. Estes achados parecem próprios da população estudada, visto que até o presente momento, tabagistas ativos mostram um maior risco em desenvolver LES e um pior prognóstico.

As variantes alélicas estudadas não apresentaram influência nos índices SLEDAI, SLICC e nas manifestações clínicas e laboratoriais de pacientes com LES. Isto indica que nesta população, os haplótipos associados à produção deficiente, baixa e alta da MBL não interferiram na expressão fenotípica da doença.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO I - CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO [111]:

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

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

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

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

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

6. Serosite:

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

ou

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

7. Alteração renal:

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

ou

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

8. Alteração neurológica:

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

ou

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

9. Alteração hematológica:

(a) anemia hemolítica com reticulocitose.

ou

(b) leucopenia - $< 4000/\text{mm}^3$ total em 2 ou mais ocasiões.

ou

(c) linfopenia - $< 1500/\text{mm}^3$ em 2 ou mais ocasiões.

ou

(d) trombocitopenia - $< 100\ 000/\text{mm}^3$ na ausência de drogas causadoras.

10. Alteração imunológica:

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

ou

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

ou

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

11. Anticorpo antinuclear (FAN):

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

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

7.2 ANEXO II - PROTOCOLO DE PESQUISA

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

IDENTIFICAÇÃO: n° _____

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

DATA DO INÍCIO DOS SINTOMAS: ___/___/___
 DATA DO DIAGNÓSTICO: ___/___/___
 MANIFESTAÇÕES INICIAIS NO DIAGNÓSTICO: _____
 INÍCIO DO ACOMPANHAMENTO NO HCPA: ___/___/___
 ÓBITO: S N DATA: ___/___/___
 CAUSA: _____

CRITÉRIOS PARA CLASSIFICAÇÃO PARA LES (ACR 1997)

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

ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS ASSOCIADAS

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

TRATAMENTO REALIZADO

- | | | |
|---|---|---|
| <input type="checkbox"/> Corticoterapia | <input type="checkbox"/> Pulsoterapia | <input type="checkbox"/> Ciclofosfamida |
| <input type="checkbox"/> Azatioprina | <input type="checkbox"/> Cloroquina / Hidroxicloroquina | <input type="checkbox"/> Metotrexate |
| <input type="checkbox"/> Micofenolato mofetil | <input type="checkbox"/> Dapsona | <input type="checkbox"/> Ciclosporina |
| <input type="checkbox"/> Rituximabe | <input type="checkbox"/> AAS | <input type="checkbox"/> Anticoagulante |
| <input type="checkbox"/> ACO/TRH | <input type="checkbox"/> CaCo3/D3 | <input type="checkbox"/> Bisfosfonados |
| <input type="checkbox"/> Estatina | <input type="checkbox"/> Danazol | <input type="checkbox"/> Anti-hipertensivos |

7.3 ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Serviço de Reumatologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro Sr(a)., ao longo dos últimos 2 anos, você participou de uma pesquisa relacionada ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e possíveis fatores genéticos que implicam no seu surgimento e evolução. Tendo em vista que outros fatores, tais como ambientais, também estão relacionados ao aparecimento do LES, gostaríamos de contar, novamente, com a sua autorização, para uso de amostras de sangue já coletadas e armazenadas no seguinte estudo, aqui proposto:

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO HÁBITO TABAGISTA NA EXPRESSÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DOS POLIMORFISMOS DA LECTINA LIGADORA DA MANOSE EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

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

DE QUE CONSTA O ESTUDO?

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

QUAIS SÃO AS VANTAGENS DE PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

1. Avaliar fatores genético-ambientais implicados na origem e causa do LES.
2. Colaborar para o avanço e progresso do conhecimento sobre a LES e alterações genéticas associadas.
- 3.

QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS DA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO?

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

HÁ A POSSIBILIDADE DE ESTE ESTUDO CONTINUAR?

Este estudo foi planejado para encerrar em dezembro de 2010 e para avaliar a influência do tabagismo através dos genes da lecitina ligadora da manose. No entanto, é possível que mais genes e outros fatores relacionados ao surgimento do LES possam ser analisados futuramente. Para tal, o paciente, através de um novo contato com a equipe pesquisadora, deverá autorizar novamente o uso da amostra já coletada e o novo projeto deverá ser avaliado pela Comissão de Ética em Pesquisa da instituição e Conselho Nacional de Ética em Pesquisa. Outra possibilidade é a de um novo contato com o paciente em 5 ou 10 anos para verificar a evolução da doença.

DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE

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

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

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

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

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

Paciente: _____

Registro: _____ Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Porto Alegre, ____ de _____ de 200__.

Pesquisadores responsáveis:

Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier: Telefone: (051) 2101 8340; FAX: (051) 3331 3834

Guilherme Gischkow Rucatti: Telefone: (051) 8575 0611

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