

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética

CATARINA ADDOBBATI JORDÃO CAVALCANTI

**POLIMORFISMOS E PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES DO
INFLAMASSOMA EM PACIENTES BRASILEIROS COM ARTRITE REUMATOIDE
E LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Recife
2017

CATARINA ADDOBBATI JORDÃO CAVALCANTI

**POLIMORFISMOS E PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES DO
INFLAMASSOMA EM PACIENTES BRASILEIROS COM ARTRITE REUMATOIDE
E LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Profa. Dra. Paula Sandrin-Garcia

Coorientador: Profa. Dra. Jaqueline de Azevedo
Silva

Coorientador: Prof. Dr. Sergio Crovella

Recife

2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Cavalcanti, Catarina Addobbati Jordão

Polimorfismos e perfil de expressão dos genes do inflamassoma em pacientes brasileiros com artrite reumatoide e lupus eritematoso sistêmico / Catarina Addobbati Jordão Cavalcanti- Recife: O Autor, 2017.

158 folhas: Il., fig., tab.

Orientadora: Paula Sandrin-Garcia

Coorientadores: Jaqueline de Azevedo Silva e Sergio Crovella

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Genética, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Genes 2. Artrite reumatoide 3. Lupus eritematoso sistêmico I. Sandrin-Garcia, Paula (orientadora) II. Silva, Jaqueline de Azevedo (coorientadora) III. Crovella, Sergio (coorientador) IV. Título

572.86

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-253

CATARINA ADDOBBATI JORDÃO CAVALCANTI

**POLIMORFISMOS E PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES DO
INFLAMASSOMA EM PACIENTES BRASILEIROS COM ARTRITE REUMATOIDE
E LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Doutor em Genética.

Aprovado em 24/03/2017

Comissão Examinadora:

Dra. Paula Sandrin-Garcia
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Will de Barros Pita
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Ronaldo Celerino da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Marcos Andre Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

Agradeço a CAPES, CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro e ao LIKA e a UFPE pela estrutura necessária para a realização desse trabalho.

Agradeço a Deus que permitiu que eu chegasse até aqui e à minha família que me deu apoio para que isso tudo acontecesse, especialmente ao meu pai com a sua frase estimuladora “Você é jovem, você aguenta!” e à minha mãe que sempre me fez acreditar que sou capaz. Aos amigos do grupo de pesquisa PatGen, com os quais passei muitos anos convivendo diariamente, rindo, chorando, estudando e quebrando a cabeça com os experimentos, e pelos quais hoje tenho uma imensa amizade e respeito. Aos amigos e professores do LIKA e do Departamento de Genética pelas colaborações, estrutura e amizade. À minha orientadora, Paula Sandrin-Garcia, que desde a iniciação científica me acolheu e acreditou em mim.

Sem ela essa realização não teria sido possível, muitas vezes precisando ser paciente e puxando a minha orelha. A minha coorientadora Jaqueline, pelo apoio científico e amizade. Ao Prof. Sergio Crovella que me recebeu no grupo com toda sua alegria em 2008 como aluna de iniciação científica e permitiu que eu chegasse até aqui. Fecho um ciclo da minha vida com muita alegria, orgulho e gratidão de ter feito parte do grupo PatGen.

RESUMO

A Artrite Reumatoide (AR) e o Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) são doenças autoimunes e inflamatórias, com o desenvolvimento associado a fatores genéticos e ambientais. Polimorfismos e a expressão diferencial dos componentes do inflamassoma foram associados ao desenvolvimento de distúrbios inflamatórios. No presente estudo, foi avaliada a possível associação genética entre componentes do inflamassoma e o desenvolvimento da AR e LES. Polimorfismos em genes do inflamassoma (*NLRP1*, *NLRP3*, *NLRP4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*) e no *IL1B* e *IL18* foram genotipados em pacientes com AR e LES e indivíduos saudáveis. Também foi avaliada a expressão gênica diferencial dos componentes do inflamassoma em monócitos, estimulados ou não com LPS+ATP. Observamos a associação do polimorfismo rs10754558 no gene *NLRP3* com a susceptibilidade à AR e ao LES, assim como com o desenvolvimento de nefrite lúpica. Também observamos a associação do rs2043211 no *CARD8* com a severidade da AR e do rs1143643 no *IL-18* com a ocorrência de fotossensibilidade nos pacientes com LES. A análise de expressão diferencial mostrou que monócitos de pacientes com AR apresentam uma ativação crônica dos genes *CASP1*, *IL1B* e *IL1R*. Quando estimulados, *NLRP3* e *NLRP4* também se mostraram induzidos. Em indivíduos com LES, os genes *NLRP1*, *CASP1* e *IL1B* mostraram maior expressão em monócitos não estimulados, enquanto o *NLRP3* mostrou maior expressão frente a estímulo. O presente estudo aponta o envolvimento de genes do inflamassoma no desenvolvimento do LES e AR.

Palavras-chave: Inflamassoma. Artrite reumatoide. Lupus eritematoso sistêmico.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) and Systemic Lupus Erythematosus (SLE) are autoimmune diseases with genetic and environmental factors associated to their development. Polymorphisms and differential expression of inflammasome components have been correlated with different inflammatory diseases. In the present study, we examined the possible genetic association between inflammasome components and the development of RA and SLE. We analyzed 13 polymorphisms within inflammasome genes (*NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*) and *IL1B* and *IL18* genes. We also evaluated the expression of inflammasome genes in resting and LPS+ATP-treated monocytes from RA and SLE patients compared to healthy controls. Our results showed that rs10754558 *NLRP3* polymorphism is associated with RA and SLE development as well as the occurrence of lupus nephritis. Furthermore, the polymorphisms rs2043211 in *CARD8* and rs1143643 in *IL1B* gene were associated to RA severity and photosensitivity in SLE patients, respectively. Gene expression analyses in peripheral blood derived-monocytes showed that RA patients display a chronic activation of *CASP1*, *IL1B* and *IL1R* genes. In LPS+ATP-stimulated monocytes, *NLRP3* and *NLRC4* expression were also significantly higher in RA patients. In SLE patients, *NLRP1*, *CASP1* and *IL1B* genes were upregulated in non-stimulated monocytes from SLE patients compared to controls. In stimulated-monocytes, *NLRP3* expression was also significantly higher. Our results support the role of inflammasome genes in the development of RA and SLE as well as in both disease's severity and clinical manifestations.

Key words: Inflammasome. Rheumatoid arthritis. Systemic lupus erythematosus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - MODELO GERAL PARA O DESENVOLVIMENTO DA AR, COM INFLUÊNCIA DOS FATORES GENÉTICOS E AMBIENTAIS.....	19
FIGURA 2 - PRINCIPAL CARACTERÍSTICA DA AR: POLIARTRITE SIMÉTRICA.....	20
FIGURA 3 - ARQUITETURA HISTOLÓGICA DA ARTICULAÇÃO: A) EM UM INDIVÍDUO SAUDÁVEL; B) EM UM INDIVÍDUO COM AR.....	22
FIGURA 4 - FATORES GENÉTICOS, AMBIENTAIS, IMUNOLÓGICOS, HORMONAIS E EPIGENÉTICOS ATUANDO JUNTOS PARA O DESENVOLVIMENTO DO LES E CONSEQUENTE DANO A DIFERENTES ÓRGÃOS.....	33
FIGURA 5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS APRESENTADAS PELOS PACIENTES COM LES, ENVOLVENDO OS DIFERENTES ÓRGÃOS E SISTEMAS.....	40
FIGURA 6. MANIFESTAÇÕES CUTÂNEAS DO LES: A. RASH MALAR. B. FOTOSSENSIBILIDADE. C. RASH DISCOIDE.....	42
FIGURA 7. ALTERAÇÕES CAUSADAS PELO FÊNOMENO DE RAYNAUD.....	42
FIGURA 8. ARTRITE DESENCADEADA PELO LES.....	43
FIGURA 9. GENES ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DO LES COM SUAS RESPECTIVAS FUNÇÕES.....	50
FIGURA 10. GENES ASSOCIADOS À AR AO LONGO DOS ANOS. AS	

BARRAS EM AZUL INDICAM OS GENES ASSOCIADOS EM CAUCASIANOS, ENQUANTO OS LOCI VALIDADOS EM POPULAÇÃO ASIÁTICA SÃO VISTOS NAS BARRAS EM LARANJA.....	52
FIGURA 11. DIFERENTES TIPOS DE INFLAMASSOMA JÁ DESCRITOS, OS QUAIS SÃO ATIVADOS POR DIFERENTES PAMPS E DAMPS.....	58
FIGURA 12. INFLAMASSOMA NLRP3. PROCESSAMENTO DA PRO-IL-1B APÓS ESTÍMULO POR PAMPS E DAMPS.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DA AR DO COLEGIADO AMERICANO DE REUMATOLOGIA (ACR) E <i>EUROPEAN LEAGUE AGAINST RHEUMATISM</i> (EULAR).....	27
TABELA 2 - HEALTH ASSESSMENT QUESTIONNAIRE (HAQ): ÍNDICE CLÍNICO PARA AVALIAÇÃO DA PERDA DA CAPACIDADE FUNCIONAL.....	29
TABELA 3 - CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO DO LES DE ACORDO COM O COLEGIADO AMERICANO DE REUMATOLOGIA (ACR).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACPA	- Anticorpo antiproteína citrulinada
ACR	- Colegiado americano de reumatologia
AIM2	- Do inglês, absent in melanoma 2
ANA	- Anticorpos antinucleares
AR	- Artrite reumatoide
ASC	- Do inglês, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
CCL	- Quimiocina ligante
CD	- Do inglês, cluster differentiation
CTLA-4	- Antígeno de linfócito T citotóxico 4
CXCL	- Quimiocina motivo C-X-C ligante
DAMP	- Padrão molecular associado ao perigo
DAS	- Do inglês, Disease activity index
DNA	- Ácido Desoxirribonucleico
EC	- Epítipo compartilhado
ETS1	- V-ets vírus da eritroblastose homólogo 1 do oncogene E2
EULAR	- Do inglês, European League Against Rheumatism
EVA	- Escala Visual Analógica
FAN	- Fator antinuclear
FCGR	- Receptor Fc gama
FR	- Fator reumatoide
HAQ	- Do inglês, Health assessment questionnaire
HLA	- Antígeno leucocitário humano

IFN	- Interferon
IL	- Interleucina
IRF	- Fatores regulador de interferon
JNK	- Proteína cinase ativada por mitógeno 8
LES	- Lupus Eritematoso Sistêmico
LPS	- Lipopolissacarideo
MAPK	- Proteína cinase ativada por mitógeno
MBL	- Lectina ligadora de manose
MHC	- Complexo maior de histocompatibilidade
NLR	- Receptor semelhante a NOD
NLRP1	- Do inglês, NLR, pyrin domain containing 1
NLRP3	- Do inglês, NLR, pyrin domain containing 3
NLRC4	- Do inglês, NLR, CARD domain containing 4
OR	- Odds Ratio
PADI	- Peptidilarginina deiminase
PAMP	- Padrão molecular associado a patógenos
PRR	- Receptor de reconhecimento de patógenos
PRDM1	- Domínio contendo 1 PR, com domínio ZNF
PTPN22	- Proteína tirosina fosfatase, não-receptor tipo 22
RLR	- Receptor “retinoic acid-inducible gene I-like”
RNA	- Ácido ribonucleico
SLEDAI	- Do inglês, SLE Disease Activity Index
SNP	- Polimorfismo de base única
STAT4	- Sinal de transdução e ativação do fator de transcrição 4
TLR	- Receptor semelhante a Toll

TNFAIP3 - Do inglês, tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3

TRAF1 - Fator 1 associado ao receptor de TNF

TREX1 - Exonuclease de reparação 1

VDR - Receptor de vitamin D

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 ARTRITE REUMATOIDE.....	18
2.1.1 Epidemiologia da artrite reumatoide.....	18
2.1.2 Imunopatogênese da artrite reumatoide.....	19
2.1.3 Critérios de diagnóstico e índices clínicos da artrite reumatoide.....	26
2.1.4 Fatores ambientais da artrite reumatoide.....	30
2.2 LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.....	31
2.2.1 Eepidemiologia do lupus eritematoso sistêmico.....	31
2.2.2 Imunopatogênese do lupus eritematoso sistêmico.....	33
2.2.3 Manifestações clínicas/laboratoriais e diagnóstico do lupus eritematoso sistêmico.....	40
2.2.4 Fatores ambientais do lupus eritematoso sistêmico.....	47
2.3 FATORES GENÉTICOS DA ARTRITE REUMATOIDE E DO LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.....	49
2.4 INFLAMASSOMA.....	56
2.5 ENVOLVIMENTO DO INFLAMASSOMA COM A ARTRITE REUMATOIDE E O LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.....	59
3 OBJETIVOS.....	64
4 CAPITULO I.....	65
5 CAPITULO II.....	97
6 DISCUSSÃO GERAL.....	126

7 CONCLUSÕES.....	130
REFERÊNCIAS.....	131
ANEXOS.....	147
NORMAS DO PERIÓDICO JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE.....	147
NORMAS DO PERIÓDICO EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS.....	150
OUTRAS PRODUÇÕES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO.....	153
CURRICULO LATTES.....	158

1 INTRODUÇÃO

A Artrite Reumatoide (AR) e o Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) estão entre as doenças autoimunes mais prevalentes mundialmente com impacto significativo na atividade laboral e qualidade de vida dos pacientes. Apesar da etiologia desconhecida, sabe-se que as duas doenças são desordens multifatoriais, com o seu desenvolvimento associado a fatores ambientais e genéticos.

A detecção de polimorfismos genéticos tem emergido como alvo de diversos estudos sobre a AR e o LES com o objetivo de detectar não apenas genes envolvidos na susceptibilidade, mas também envolvidos na gravidade e resposta terapêutica. A maioria dos genes associados com o desenvolvimento de ambas doenças estão direta ou indiretamente envolvidos com a resposta imune, sendo os genes do complexo do antígeno leucocitário humano os principais fatores genéticos de risco conhecidos até o momento.

A patogênese da AR e do LES envolve desordens tanto na resposta imune inata como adaptativa. Níveis elevados de citocinas pro-inflamatórias, tais como a interleucina (IL)-1 β e IL-18, secretadas por monócitos, macrófagos e células dendríticas, estão presentes nessas doenças. A secreção dessas citocinas é induzida pela ativação do inflamassoma, complexo multiproteico capaz de promover o processamento e maturação da IL-1 β e IL-18.

A ativação do inflamassoma é dependente da ativação de receptores intracelulares pertencentes à família dos Receptores semelhantes a Nod e dos Receptores PHIN, tais como NLRP1, NLRP3, NLRC4 e AIM2; da molécula adaptadora ASC e da proteína efetora caspase-1. Após a detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou de padrões moleculares

associados ao perigo (DAMPs), os receptores intracelulares recrutam a proteína adaptadora ASC, a qual cliva a procaspase-1 em caspase-1. A proteína caspase-1 ativada processa as citocinas pro-IL-1 β e pro-IL-18 em suas formas ativas e secretadas.

Mutações nos genes do inflamassoma são capazes de causar desordens inflamatórias caracterizadas por níveis constitutivamente elevados de IL-1 β , contribuindo para uma inflamação sistêmica. Polimorfismos e a expressão diferencial desses genes já foram associados a diferentes doenças com caráter inflamatório crônico, tais como Psoríase, Doença de Crohn e Vitiligo, em diferentes populações.

Com a hipótese de que tais polimorfismos genéticos possam acarretar alterações na ativação do complexo proteico do inflamassoma e contribuir com o desenvolvimento da AR e do LES, o presente estudo avaliou a possível associação de polimorfismos genéticos nos principais genes do inflamassoma, *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8* e *CASP1*, e nos genes *IL1B* e *IL18* com a susceptibilidade à AR e ao LES e suas principais manifestações. Além disso, foi avaliada a expressão gênica diferencial do *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *ASC/PYDCARD*, *CASP1*, *IL1B* e *IL1R* em monócitos de indivíduos com AR e também com LES, não-estimulados e estimulados *in vitro* com LPS e ATP, atuando como uma PAMP e um DAMP, respectivamente, mimetizando assim a ativação do inflamassoma.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ARTRITE REUMATOIDE

2.1.1 Epidemiologia da artrite reumatoide

A prevalência mundial da AR têm sido estimada em torno de 0,5 a 1% na população adulta, com grande variação nas diferentes regiões. A AR afeta de duas a três vezes mais o sexo feminino, com o início da doença em qualquer idade, porém com pico de incidência entre a quarta e a quinta décadas de vida (Smolen *et al.*, 2016). Uma maior prevalência é observada na Europa e América do Norte, com uma taxa de 0,5 a 1,1% (Aho *et al.*, 1998; Power *et al.*, 1999; Gabriel *et al.*, 1999; Simonsson *et al.*, 1999; Riise *et al.*, 2001; Symmons *et al.*, 2002). Na Ásia, a prevalência varia entre 0,1 a 0,3%. Na América do Sul, foi reportada uma prevalência de 0,2% na Argentina e 0,1% na Colômbia (Spindler *et al.*, 2002; Alamanos e Drosos, 2005).

No Brasil, observou-se uma prevalência de 0,2% a 1% (Marques Neto *et al.*, 1993). Numa análise das características demográficas dos pacientes brasileiros, do estado de São Paulo, observou-se que 86% dos pacientes eram do sexo feminino, caucasianas, com idade entre a quarta e quinta década, concordando com as características observadas mundialmente (Louzada-Junior *et al.*, 2007).

A incidência anual da AR varia entre 20 a 50 casos por 100.000 habitantes nos países da América do Norte e no norte europeu (Symmons *et al.*, 1994; Doran *et al.*, 2002; Soderlin *et al.*, 2002; Alamanos *et al.*, 2006). No sul da Europa, estudos indicam uma incidência menor, entre 0,01 e 0,02% (Guillemin *et al.*, 1994; Drosos *et al.*, 1997; Akar *et al.*, 2004). Na Ásia, a incidência varia entre 0,03 a 0,09% (Lau *et al.*, 1993; Dai *et al.*, 2003).

A expectativa de vida dos pacientes com AR diminui de 3 a 10 anos de acordo com a severidade e idade de aparecimento da doença. As causas de morte dos indivíduos com AR não diferem da população geral, entretanto, esses pacientes morrem mais precocemente (Wolfe *et al.*, 1994; Doran *et al.*, 2002; Gabriel *et al.*, 2003). Além disso, em 10 anos após o diagnóstico da AR, metade dos indivíduos tem sua capacidade laboral reduzida (Goeldner I *et al.*, 2011).

2.1.2 Imunopatogênese da artrite reumatoide

A AR é uma doença autoimune com o seu desenvolvimento associado a fatores genéticos e ambientais (Figura 1) (Tsokos, 2011). A imunopatogênese da AR é caracterizada principalmente por uma inflamação crônica com destruição da sinóvia e consequente dano à articulação e perda funcional (Smolen *et al.*, 2016).

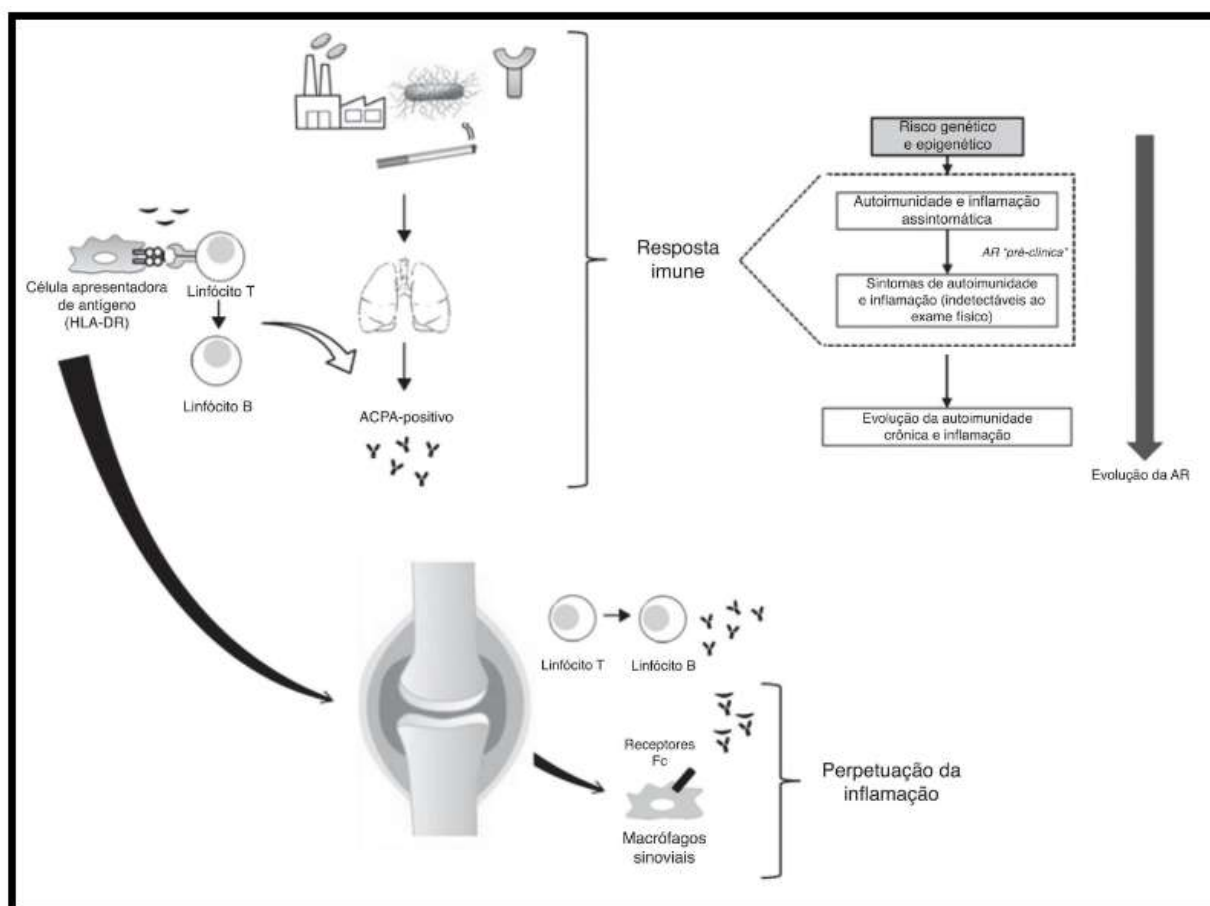


Figura 1. Modelo geral para o desenvolvimento da AR, com influência dos fatores genéticos e ambientais (Fonte: adaptado de Castro-Santos *et al.*, 2016)

As alterações iniciais incluem o aumento do número de células e da vascularização e a infiltração por diferentes células na sinóvia. Essas alterações são crônicas, levando a uma destruição progressiva do tecido cartilaginoso e ósseo, estabelecendo uma poliartrite severa, a qual geralmente se manifesta de forma simétrica (Figura 2) (Koopman, 2001; Stoffer *et al.*, 2016).



Figura 2. Principal característica da AR: poliartrite simétrica (Fonte: www.artriterreumatoide.com.br).

As manifestações da AR também podem incluir manifestações extra-articulares, tais como nódulos reumatoides, manifestações pulmonares, vasculite e comorbidades sistêmicas (Koopman, 2001; Stoffer *et al.*, 2016).

Na sua arquitetura normal, a sinóvia apresenta uma camada íntima de revestimento e logo abaixo vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e adipócitos dentro de uma matriz fibrosa. A camada íntima apresenta dois principais tipos de células: sinoviócitos semelhantes a fibroblastos e sinoviócitos semelhantes a macrófagos. Fisiologicamente, esses últimos apresentam o papel de fagócitos, enquanto a função dos fibroblastos sinoviais é nutrir a cavidade da articulação e a cartilagem com proteínas plasmáticas e moléculas lubrificantes, tal como o ácido hialurônico. Outra importante função é o remodelamento contínuo da matriz

tecidual através da produção de colágeno e enzimas (Kinne *et al.*, 2007; Leech e Morand, 2013; Smolen *et al.*, 2016).

A arquitetura histológica da sinóvia na AR é alterada através do aumento do número de sinoviócitos, levando a um aumento da espessura da íntima, e da infiltração por células mononucleares na sub-íntima. Além disso, os sinoviócitos apresentam suas funções alteradas, como por exemplo, uma produção exacerbada de citocinas pro-inflamatórias e a capacidade de infiltração na cartilagem e no osso (Muller-Ladner *et al.*, 2007; Hitchon and El-Gabalawy, 2011).

A camada íntima passa então a ser a fonte primária da produção de citocinas e também de proteases que contribuirão para a destruição articular. Uma proliferação tecidual exacerbada se estabelece, com a formação de um tecido hiperplásico e inflamado, denominado *Pannus*. Células plasmáticas, linfócitos B, T e células Natural Killer, e células dendríticas, acumulam-se na sinóvia, distribuindo-se difusamente na sub-íntima ou organizadamente em agregados linfocitários. No líquido sinovial, o qual se apresenta aumentado na AR, encontram-se predominantemente os neutrófilos (Hitchon and El-Gabalawy, 2011).

Os macrófagos apresentam-se em um número elevado na membrana sinovial inflamada e na junção *pannus*-cartilagem. Juntos aos fibroblastos, os macrófagos apresentam importante papel pro-inflamatório, contribuindo consideravelmente com o dano às articulações. O envolvimento dos macrófagos na patogênese da AR estende-se tanto aos monócitos, como para outras células do sistema fagocítico mononuclear (Kinne *et al.*, 2007; Hitchon and El-Gabalawy, 2011).

A diferença entre uma articulação normal e na AR pode ser observada na Figura 3 abaixo:

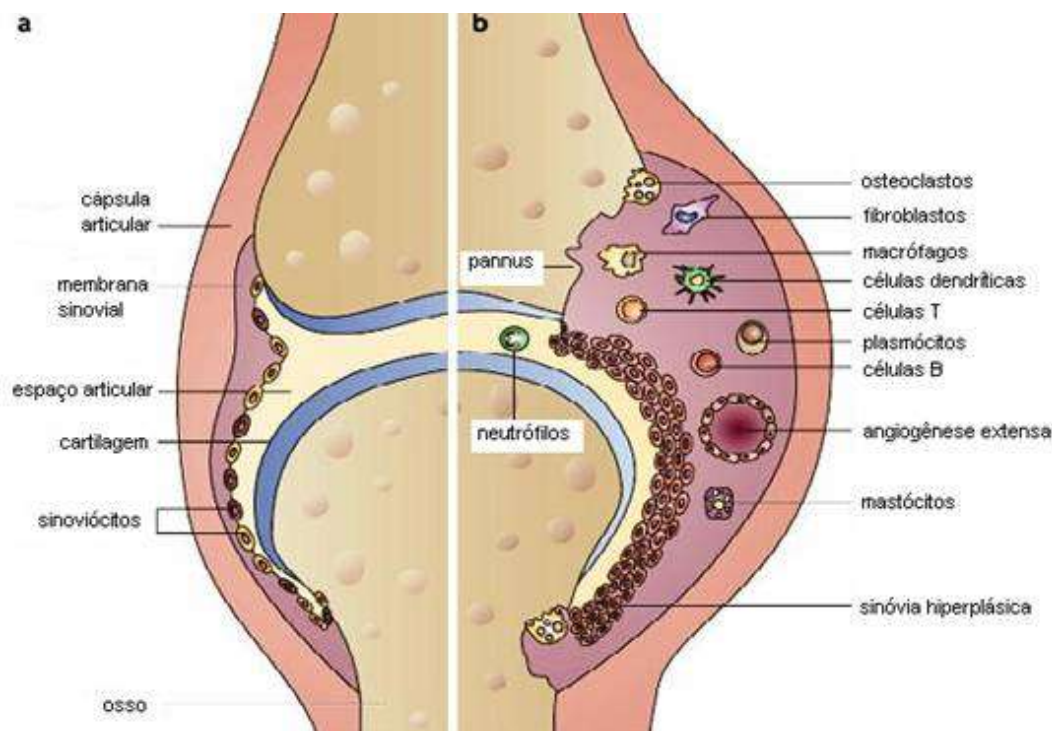


Figura 3. Arquitetura histológica da articulação: a) em um indivíduo saudável; b) em um indivíduo com AR (adaptado de Smolen *et al.*, 2016).

Uma das principais citocinas envolvidas na AR é o fator de necrose tumoral (TNF)- α , o qual está diretamente envolvido na inflamação sinovial e destruição da articulação (Arend, 2001; Oliver *et al.*, 2008).

O TNF- α induz a liberação de várias citocinas e metaloproteinases pelos fibroblastos, diminui a síntese de proteoglicanos e está envolvido na diferenciação de monócitos para osteoclastos. O uso de inibidores de TNF- α melhoram os sintomas e sinais clínicos da AR e mostram também diminuir a erosão óssea (Arend, 2001; Oliver *et al.*, 2008).

Na AR, níveis elevados da citocina IL-1 são secretados por monócitos, macrófagos e células dendríticas. A IL-1 exibe muitas propriedades que podem contribuir para a inflamação na AR, incluindo o aumento de síntese de IL-6, quimiocinas, prostaglandinas e collagenases. A IL-18, outra citocina presente na imunopatogênese da AR, induz a produção de Interferon- γ , IL-8 e TNF- α pelos macrófagos da sinóvia. A IL-18 polariza a resposta imune das células T para o fenótipo Th1, relacionado com a resposta autoimune (Koopman, 2001; Arend, 2001; Oliver *et al.*, 2008).

A IL-1 β e IL-18 participam de forma importante na reabsorção óssea e na destruição da cartilagem na AR. A IL-18 tem papel na quimiotaxia de leucócitos e angiogênese, contribuindo para a destruição da cartilagem (Volin *et al.*, 2011). A IL-1 β , junto a IL-6 e IL-23, promove a diferenciação das células T auxiliares 17 (Th17), as quais estão fortemente relacionadas à autoimunidade órgão-específica (Chung *et al.*, 2009).

A citocina IL-17 produzida atrai neutrófilos, células T CD4⁺ e células B para a sinóvia, contribuindo para a transição da fase aguda da AR para a fase crônica (Leipe *et al.*, 2010; Ferraccioli G and Zizzo G, 2011).

A inibição terapêutica da IL-1 mostrou reduzir os sinais e sintomas da AR, assim como os achados radiológicos de dano articular. Modelos animais para AR, como por exemplo, na indução da artrite por colágeno ou por antígeno, respondem de forma satisfatória à inibição da IL-1 (Bresnihan *et al.*, 1998; Joosten *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2000; Alten *et al.*, 2008).

As citocinas TNF- α e IL-1 são capazes de induzir a expressão gênica de metaloproteinases, as quais são enzimas que participam da remodelação e degradação da matriz extracelular. Entre as metaloproteinases estão as

colagenases, que degradam colágenos de diferentes tipos. Na AR, observa-se um aumento das metaloproteinases nas primeiras semanas ou meses de desenvolvimento da doença. Níveis elevados dessas enzimas estão relacionados com uma maior severidade da doença (Bartok e Firestein, 2010).

A autoimunidade presente na AR é caracterizada pela produção do Fator Reumatoide (FR) e dos anticorpos contra as proteínas citrulinadas (ACPA). A produção desses autoanticorpos pode preceder o aparecimento dos sintomas clínicos e diagnóstico da doença em até 10 anos. Sua presença é associada com um desenvolvimento mais severo e maior mortalidade dos pacientes (Teixeira *et al.*, 2007; Nell-Duxneuner *et al.*, 2010; Barra *et al.*, 2011; Rombouts *et al.*, 2015).

O FR é um autoanticorpo dirigido contra a porção Fc da imunoglobulina G e está presente em 70% a 90% dos pacientes com AR. Sua especificidade é de 59% a 65%, podendo ser encontrado em outras condições clínicas. Na AR, o FR, apesar de não ser um marcador para diagnóstico, tem grande importância no prognóstico. Indivíduos com títulos altos e persistentes de FR têm um pior desenvolvimento da doença (Teixeira *et al.*, 2007; Nell-Duxneuner *et al.*, 2010; Barra *et al.*, 2011; Rombouts *et al.*, 2015).

O ACPA está associado com a progressão erosiva óssea da AR e, portanto, também com pior prognóstico. Esses anticorpos podem ser detectados em aproximadamente 80% dos pacientes com AR com especificidade de 95% a 99% (Teixeira *et al.*, 2007; Nell-Duxneuner *et al.*, 2010; Barra *et al.*, 2011; Rombouts *et al.*, 2015).

Uma variedade de proteínas citrulinadas estão presentes na articulação na AR, incluindo o fibrinogênio, o colágeno e a fibronectina. A citrulina não é um aminoácido-padrão, e sua presença em proteínas deve-se a uma modificação

pós-traducional da arginina catalisada pela enzima peptidilarginina deiminase (PADI) (Alarcon e Andrade, 2007; Smolen *et al.*, 2016).

Macrófagos e granulócitos expressam PADI2, enzima que está inativa em condições fisiológicas normais, devido à baixa concentração de cálcio intracelular. Durante a morte dessas células, os processos homeostáticos falham e íons de cálcio entram nas células, ativando a PADI. Dessa forma, proteínas intracelulares como vimentina e histona são citrulinadas e podem ganhar o meio extracelular. Além disso, a própria enzima PADI pode extravasar e citrulinar proteínas extracelulares, como a fibrina (Alarcon e Andrade, 2007; Smolen *et al.*, 2016).

Essas proteínas citrulinadas expostas ao sistema imunológico sob condições favoráveis, como no contexto da sinóvia inflamada, podem levar a uma resposta imunológica específica. Embora a citrulinação seja um fenômeno normal em indivíduos saudáveis, desvios na intensidade, localização e persistência de citrulinação podem acarretar reações imunológicas exacerbadas (Alarcon e Andrade, 2007; Trouw *et al.*, 2009; Smolen *et al.*, 2016).

Na AR, o ACPA liga-se aos diferentes epítomos citrulinados da cartilagem e da sinóvia. Como consequência, as vias clássica e alternativa do sistema complemento são ativadas, acarretando na infiltração de macrófagos. A presença exacerbada dos macrófagos leva a mais citrulinação e dano enzimático e oxidativo das proteínas estruturais da cartilagem e sinóvia e, consequentemente, formação de neoepítomos (Alarcon e Andrade, 2007; Trouw *et al.*, 2009; Smolen *et al.*, 2016).

As células dendríticas presentes na sinóvia reconhecem e processam esses peptídeos próprios alterados e, em seguida, migram para os linfonodos regionais onde ocorre ativação das células T específicas, contribuindo dessa

maneira com o processo autoimune (Alarcon e Andrade, 2007; Trouw *et al.*, 2009; Smolen *et al.*, 2016).

2.1.3 Critérios de diagnóstico e índices clínicos da artrite reumatoide

Embora o diagnóstico da AR dependa da associação de uma série de sintomas e sinais clínicos sistêmicos assim como achados laboratoriais e radiográficos, a principal característica da AR é a persistente sinovite, geralmente envolvendo as articulações periféricas com uma distribuição simétrica (Laurindo *et al.*, 2004; da Mota *et al.*, 2012).

O curso da AR pode ser variável. Alguns pacientes podem apresentar apenas sintomas oligoarticulares de curta duração com poucas lesões ou evoluir para uma poliartrite progressiva que culminará em acentuada incapacidade funcional. Para o diagnóstico definitivo da AR é necessário um período de acompanhamento do paciente, uma vez que o mesmo pode ser difícil no início da doença, quando existem apenas sintomas intermitentes e também característicos de artralguas e artrose (Laurindo *et al.*, 2004; da Mota *et al.*, 2012).

Em 2010, um novo critério de diagnóstico da AR foi apresentado pelo Colegiado Americano de Reumatologia (ACR) e *European League Against Rheumatism* (EULAR) (Tabela 1). O diagnóstico é guiado por 4 categoriais com pontuação para cada uma delas: envolvimento articular; sorologia (incluindo FR e/ou ACPA), duração dos sintomas (se menor ou maior do que 6 semanas); e biomarcadores de fase aguda (proteína C reativa e/ou velocidade de hemossedimentação) (Aletaha *et al.*, 2010).

Tabela 1. Critérios de diagnóstico da AR do Colegiado Americano de Reumatologia (ACR) e *European League Against Rheumatism* (EULAR) (Aletaha et al., 2010).

População-alvo (quem deve ser testado?)	
Paciente com pelo menos uma articulação com sinovite clínica definida (edema).* Sinovite que não seja melhor explicada por outra doença. *Os diagnósticos diferenciais são diferentes em pacientes com diferentes apresentações, mas podem incluir condições tais como lúpus eritematoso sistêmico, artrite psoriática e gota. Se houver dúvidas quanto aos diagnósticos diferenciais relevantes um reumatologista deve ser consultado.	
Critério de classificação para AR (algoritmo baseado em pontuação: soma da pontuação das categorias A-D). Pontuação maior ou igual a 6 é necessária para classificação definitiva de um paciente como AR	
Envolvimento articular ^A	
1 grande articulação ^B	0
2-10 grandes articulações	1
1-3 pequenas ^C articulações (com ou sem envolvimento de grandes articulações)	2
4-10 pequenas articulações (com ou sem envolvimento de grandes articulações)	3
>10 articulações ^D (pelo menos uma pequena articulação)	5
Sorologia ^E (pelo menos o resultado de um teste é necessário para classificação)	
FR negativo <u>e</u> AAPC negativo	0
FR positivo em título baixo <u>ou</u> AAPC positivo em título baixo	2
FR positivo em título alto <u>ou</u> AAPC positivo em título alto	3
Provas de fase aguda ^F (pelo menos o resultado de um teste é necessário para classificação)	
PCR normal <u>e</u> VHS normal	0
PCR anormal <u>ou</u> VHS anormal	1
Duração dos sintomas ^G	
< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1

^A O envolvimento articular se refere a qualquer articulação edemaciada ou dolorosa ao exame físico e pode ser confirmado por evidências de sinovite detectada por um método de imagem. As articulações interfalangeanas distais (IFDs), primeira carpometacarpiana (CMTC) e primeira metatarsofalangeana (MTF) são excluídas da avaliação. As diferentes categorias de acometimento articular são definidas de acordo com a localização e o número de articulações envolvidas (padrão ou distribuição do acometimento articular). A pontuação ou colocação na categoria mais alta possível é baseada no padrão de envolvimento articular;

^B São consideradas grandes articulações: ombros, cotovelos, quadris, joelhos e tornozelos; ^C São consideradas pequenas articulações: punhos, MTFC, IFP, interfalangeana do primeiro quirodáctilo e articulações MTF; ^D Nesta categoria, pelo menos uma das articulações envolvidas deve ser uma pequena articulação; as outras articulações podem incluir qualquer combinação de grandes e pequenas articulações, bem como outras não especificamente mencionados em outros lugares (por exemplo, temperomandibular, acromioclavicular e esternoclavicular); ^E Negativo refere-se a valores (Unidade Internacional-UI) menores ou iguais ao limite superior normal (LSN) para o método e laboratório. Título positivo baixo corresponde aos valores (UI) maiores que o LSN, mas menores ou iguais a três vezes o LSN para o método e laboratório. Título positivo alto: valores maiores que 3 vezes o o LSN para o método e laboratório. Quando o FR só estiver disponível como positivo ou negativo, um resultado positivo deve ser marcado como "positivo em título baixo"; ^F Normal / anormal é determinado por padrões laboratoriais locais (Outras causas de elevação das provas de fase aguda devem ser excluídas); ^G Duração dos sintomas se refere ao relato do paciente quanto a duração dos sintomas ou sinais de sinovite (por exemplo, dor, inchaço) nas articulações que estão clinicamente envolvidas no momento da avaliação, independentemente do status do tratamento; FR = fator reumatoide; AAPC = anticorpos antiproteína/ peptídeo citrulinados; LSN = limite superior do normal; VHS = velocidade de hemossedimentação; PCR = proteína C-reativa.

Quanto à gravidade da doença, a AR costuma ser dividida em leve, moderada e grave. O diagnóstico precoce e o início imediato do tratamento são fundamentais para o controle da atividade da doença e para prevenir incapacidade funcional e lesão articular irreversível. Cerca de 70% dos pacientes com doença ativa desenvolvem alterações articulares dentro dos dois primeiros anos da doença (Lipsky, 2008).

A atividade da doença e a perda da capacidade funcional podem ser avaliados pelos índices clínicos DAS (do inglês, Disease Activity Score) (Prevoo *et al.*, 1995; Van Gestel *et al.*, 1998) e HAQ (do inglês, Health Assessment Questionnaire) (Ramey *et al.*, 1996), respectivamente.

Uma vez que a AR não tem cura, e sim, apenas remissão, o DAS permite coletar informações sobre a atividade da doença na prática clínica. É necessário que o clínico avalie o número de articulações edemaciadas e com dor e que seja realizado o teste laboratorial de velocidade de hemossedimentação ou a quantificação da proteína C reativa (Aletaha, 2005; Pinheiro 2007).

Também é realizada a avaliação global da saúde do paciente que é obtida por uma Escala Visual Analógica (EVA) de 0 a 100. O cálculo do DAS através de uma fórmula com tais parâmetros irá fornecer uma escala de 0 a 10, indicando o quanto ativa está a doença no momento. O DAS convencional avalia 44 articulações, enquanto o DAS simplificado, chamado DAS28, avalia apenas 28 articulações. O DAS 28 demonstra ótima correlação (0,97) com a atividade da doença quando comparado com o DAS convencional e, devido ao menor número de articulações avaliadas, é muito mais prático tanto para avaliar a atividade da doença num determinado tempo de evolução da AR, como para avaliar se houve resposta clínica ao tratamento administrado (Aletaha, 2005; Pinheiro 2007).

O HAQ é uma medida genérica da escala de dor utilizada para avaliar a incapacidade do paciente e, conseqüentemente, a severidade da AR. O questionário aborda 20 questões relacionadas a atividades diárias divididas em oito categorias: higiene, alimentação, vestuário, capacidade de levantar-se e caminhar, alcance e preensão de objetos e realização de tarefas diárias. As possíveis respostas são: 0 = sem dificuldades, 1 = pouca dificuldade, 2 = muita dificuldade, 3 = impossível realizar. O escore é calculado pela média dos valores encontrados em cada categoria (Ramey *et al.*, 1996) (Tabela 2).

Tabela 2. Health Assessment Questionnaire (HAQ): índice clínico para avaliação da perda da capacidade funcional (Ramey *et al.*, 1996).

Atividade	Sem dificuldade 0	Pouca dificuldade 1	Muita dificuldade 2	Não consegue 3	Maior valor
1. Vestir-se, inclusive amarrar os cordões dos sapatos e abotoar as roupas					
2. Lavar sua cabeça e seus cabelos					
3. Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braços					
4. Deitar-se e levantar-se da cama					
5. Cortar pedaços de carne					
6. Levar à boca um copo ou xícara cheio de café, leite ou água					
7. Abrir um saco (caixa) de leite comum					
8. Caminhar em lugares planos					
9. Subir 5 degraus					
10. Lavar e secar seu corpo após o banho					
11. Tomar banho de chuveiro					
12. Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário					
13. Levantar os braços e pegar um objeto de aproximadamente 2,5 quilos que está posicionado pouco acima da cabeça					
14. Curvar-se para pegar roupas no chão					
15. Segurar-se em pé no ônibus ou metrô					
16. Abrir potes ou vidros de conservas que tenham sido previamente abertos					
17. Abrir e fechar torneiras					
18. Fazer compras nas redondezas onde mora					
19. Entrar e sair de um ônibus					
20. Realizar tarefas tais como usar vassoura para varrer e ou rodo para a água					
Somatório					
Somatório dividido por 8 (resultado do HAQ)					

2.1.4 Fatores ambientais da artrite reumatoide

O tabagismo é o fator ambiental predominante na AR, sendo associado a um risco duas vezes maior de desenvolvimento da doença. O tabaco é capaz de induzir a citrulinização peptídica e consequentemente estimular a produção de ACPA (Lee *et al.*, 2007; Onozaki, 2009; Klareskog *et al.*, 2011).

Infecções bacterianas e virais também são consideradas fatores envolvidos com a AR. Produtos bacterianos têm sido encontrados nas articulações de pacientes com AR na ausência de infecções ativas. Acredita-se que produtos bacterianos ou ácidos nucleicos virais possam participar indiretamente do desenvolvimento da AR em indivíduos geneticamente susceptíveis pela estimulação da imunidade inata e, consequentemente, da imunidade adaptativa (McInnes e Schett, 2011; Scher *et al.*, 2016).

Agentes infecciosos, como o vírus Epstein-Barr, o citomegalovírus e as espécies bacterianas *Proteus mirabilis* e *E. coli* têm sido ligadas a AR através do mecanismo de mimetismo molecular. A AR também tem sido associada com a doença periodontal causada pelo agente *Porphyromonas gingivalis*, o qual expressa fatores capazes de promover a citrulinização de proteínas e, consequentemente, a produção do ACPA (McInnes e Schett, 2011; Scher *et al.*, 2016).

Atualmente, estudos tem apontado para evidências relacionando o efeito do microbioma no risco e progressão da autoimunidade. Achados em modelo animal para artrite sugerem um papel essencial do microbioma intestinal no desenvolvimento da doença (Honda *et al.*, 2012; Scher *et al.*, 2016). Em humanos, estudos iniciais têm associado a disbiose gastrointestinal com a AR

precoce e também alterações na microbiota comum com a positividade para ACPA e alteração nos níveis de proteína C reativa (Scher *et al.*, 2015).

Outros potenciais fatores ambientais são: ingestão de álcool e café, níveis séricos baixos de vitamina D, uso de contraceptivos orais e baixo nível socioeconômico (Waldburger *et al.*, 2008; Millar *et al.*, 2013).

2.2 LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

2.2.1 Epidemiologia do lupus eritematoso sistêmico

A incidência e prevalência do LES diferem bastante entre as diferentes regiões do mundo (Kyttaris, 2010). As taxas de incidência variam aproximadamente de 1 a 10 a cada 100.000 pessoas por ano, enquanto a prevalência em geral varia de 20 a 70 a cada 100.000 pessoas (Pons-estel *et al.*, 2010). Esse grande intervalo observado nas taxas de prevalência e incidência deve-se principalmente a variações nos fatores genéticos populacionais e ambientais nas diferentes regiões (Vilar e Sato, 2002; Kyttaris *et al.*, 2010). Por exemplo, os descendentes de africanos e asiáticos são 2 a 3 vezes mais afetados pelo LES do que as populações caucasianas (Chakravarty *et al.*, 2007; Kyttaris *et al.*, 2010).

Até mesmo entre as diferentes regiões de um mesmo país é observada diferença nas taxas de incidência. No Brasil por exemplo, sua grande miscigenação étnica e cultural e diferentes condições climáticas podem influenciar de forma diferente no aparecimento e evolução da doença e, conseqüentemente, nas suas taxas de incidência.

Na população brasileira, estudos epidemiológicos foram realizados na cidade de Natal no Nordeste do país, o qual mostrou uma incidência anual de 8,7

a cada 100.000 pessoas, com uma maior frequência em mulheres (14,1: 2,2) (Vilar e Sato, 2002). Já na cidade de Cascavel no Paraná, sul do Brasil, foi observada uma menor incidência de 4,8 casos por 100.000 habitantes/ano (Nakashima *et al.*, 2011). A diferença de incidência encontrada entre as cidades de Cascavel e Natal pode ser explicada pela elevada intensidade dos raios ultravioleta na região geográfica de Natal (Vilar e Sato, 2002; Nakashima *et al.*, 2011), assim como pela composição étnica das cidades, uma vez que Natal tem uma maior proporção de afrodescendentes (Nakashima *et al.*, 2011).

O LES está associado ao gênero, com uma taxa que varia de 6 a 14 mulheres afetadas para cada homem afetado. Embora possa ocorrer em qualquer idade, é mais frequente entre os 20 e 45 anos, na fase reprodutiva da mulher (Kyttaris *et al.*, 2010).

As principais causas de morte do paciente com LES são infecções e eventos cardiovasculares (Nossent *et al.*, 2007). Pacientes com LES apresentam um risco 2 a 10 vezes maior de doença arterial coronariana do que a população geral (Fernández-Nebro *et al.*, 2015). Nos últimos 50 anos, foi observado o aumento da taxa de sobrevivência dos pacientes com LES, com atribuição a fatores tais como o diagnóstico precoce, opções terapêuticas mais eficazes e controle das comorbidades da doença (Lanna *et al.*, 2014). Apesar disso, o LES ainda tem um impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes e na capacidade laboral (Jolly *et al.*, 2005). Vinte e três por cento dos indivíduos com LES param de trabalhar em 5 anos após o seu diagnóstico (Al Dhanhani *et al.*, 2009).

2.2.2 Imunopatogênese do lupus eritematoso sistêmico

O LES é uma doença autoimune com o comprometimento de diversos órgãos e sistemas e apresentação de diferentes manifestações clínicas e laboratoriais (Sato *et al.*, 2006). A imunopatogênese do LES está associada a fatores genéticos e ambientais com impacto em todo o sistema imune. Alterações na resposta imune do paciente com LES estão presentes tanto na função das células B e T (Apostolidis *et al.*, 2011; Chavele e Ehrenstein, 2011), como na atuação de citocinas, quimiocinas, moléculas de sinalização e receptores de reconhecimento padrão e formação de imunocomplexos (Yu *et al.*, 2012) (Figura 4).

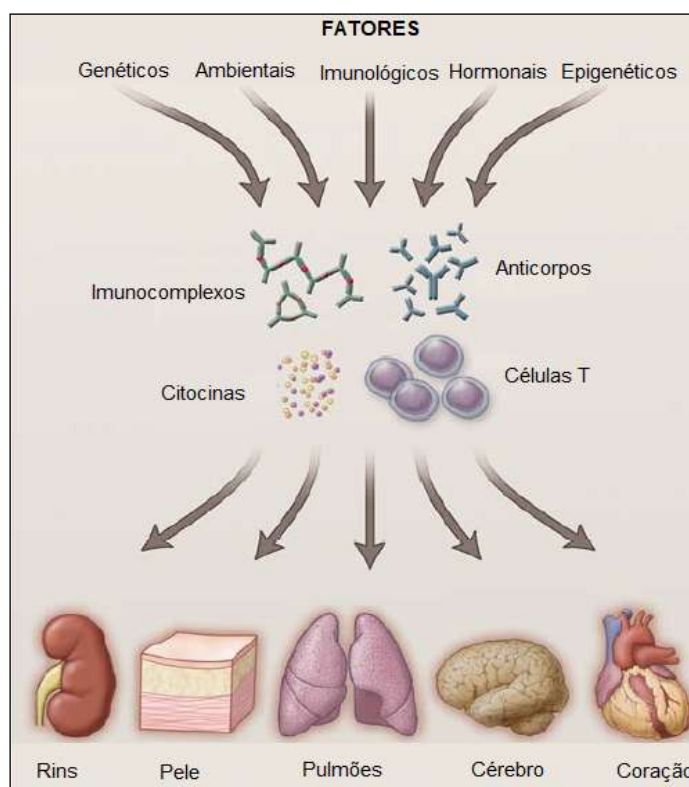


Figura 4. Fatores genéticos, ambientais, imunológicos, hormonais e epigenéticos atuando juntos para o desenvolvimento do LES e consequente dano a diferentes órgãos (Fonte: adaptada de Tsokos, 2011).

O LES é primariamente caracterizado pela deposição de imunocomplexos com o aumento da apoptose em conjunto com uma eliminação ineficiente de células mortas. Consequentemente, há a produção de níveis elevados de auto-anticorpos. Há ainda a produção desregulada de citocinas, a qual contribui para a disfunção immune do LES e então com o dano tecidual (Ohl e Tenbrock, 2011)

Determinadas citocinas tem apresentado papel fundamental no desenvolvimento do LES. Por exemplo, uma das características da doença é ter uma deficiência na produção de IL-2 pelas células T, o que contribui para a redução do número de linfócito T regulador (Tregs). Uma vez que a expansão desse tipo celular é dependente da IL-2 (Lieberman e Tsokos, 2010).

Favilli *et al.*, 2009 demonstraram níveis elevados de IL-18 em indivíduos com LES com correlação positiva com a severidade da doença. Essa citocina parece estar envolvida tanto com os eventos patogênicos iniciais como também na fase tardia da doença. No glomerulo e nos compartimentos tubulo-intersticiais dos pacientes com nefrite lúpica, foi observado um aumento de transcritos da IL-18 e níveis séricos correlacionados com a severidade da nefrite e grau de proteinúria (Kahlenberg *et al.*, 2011; Hatef *et al.*, 2013). Além disso, a IL-18 tem sido associada a disfunção endotelial em células progenitoras e alteração no reparo vascular no LES (Kahlenberg *et al.*, 2011).

Estudos em camundongos predispostos ao desenvolvimento de síndrome semelhante a lupus mostram um papel fundamental da IL-18 no desenvolvimento da doença. Camundongos MRL/ *lpr* tratados com IL-18 apresentam exacerbação da proteinúria, glomerulonefrite, vasculite e elevação de citocinas pro-inflamatórias (Esfandiari *et al.*, 2001; Neumann *et al.*, 2006). Menke *et al.*, 2011

observaram também que a inibição da IL-18 em modelo murino apresenta um importante papel na nefrite e alterações cutâneas no LES. Níveis aumentados da citocina IL-1 β foram também associados a alterações renais em pacientes com LES (Aringer e Smolen, 2005; Umare *et al.*, 2014). Além disso, Yao *et al.*, 2016 observaram níveis elevados de IL-1 β em pacientes com LES ativo. O bloqueio terapêutico da IL-1 β mostrou benefícios para os pacientes com LES (Ostendorf *et al.*, 2005).

O Interferon tipo I (IFN α e IFN β), o qual apresenta diversas funções, como antiviral, antiproliferativa e modulatória da resposta imune, apresenta níveis alterados em pacientes com LES. Uma alta produção de IFN α foi observada em famílias com pessoas afetadas pelo LES, tanto nos familiares saudáveis como nos pacientes (Niewold *et al.*, 2007; Niewold *et al.*, 2008). Isso sugere que o controle genético do IFN I é importante para a susceptibilidade à doença, mas que, para o desenvolvimento das manifestações clínicas, são necessários ainda outros fatores (Apostolidis *et al.*, 2011).

Além disso, mais de 90% dos pacientes apresentam altos níveis séricos da citocina, porém apenas 40 a 50% dos pacientes tem uma atividade significativa de IFN, sugerindo também que fatores adicionais são necessários para uma sensibilidade aos sinais liberados pelo IFN (Apostolidis *et al.*, 2011). Elevada expressão de IFN foi detectada em tecidos afetados pelo LES, como por exemplo, os rins (Bennett *et al.*, 2003; Pascual *et al.*, 2003; Ronnblom *et al.*, 2009).

Uma vez que a infiltração de linfócitos e outros leucócitos em sítios de inflamação apresenta um papel crucial na patogênese do LES e as quimiocinas tem importante função na quimiotaxia, as quimiocinas e seus receptores estão

intimamente envolvidos com a regulação da inflamação e tráfico de leucócitos nos órgãos afetados pelo LES (Yu *et al.*, 2012).

A quimiocina ligante (CCL) 2, a CCL5, a quimiocina motivo C-X-C ligante (CXCL) 9, a CXCL10 e a CXCL13 mostraram-se em níveis elevados em pacientes com LES (Wong *et al.*, 2010, Yu *et al.*, 2012). Além disso, a CCL2 e a CXCL10 mostraram concentrações elevadas no fluido do sistema nervoso central de pacientes com a síndrome neuropsiquiátrica do LES quando comparados a pacientes sem a síndrome, sendo então potenciais marcadores dessa manifestação clínica (Okamoto *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2006).

As moléculas de vias de sinalização também influenciam no desenvolvimento da autoimunidade, uma vez que podem participar da modulação da transcrição gênica, proliferação celular, apoptose e expressão de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e metaloproteinases (Crispín *et al.*, 2010). Gorjestani *et al.*, 2008 encontraram níveis elevados de ERK (Proteína cinase ativada por mitógeno 1) em linfócitos T de pacientes com LES e Wong *et al.*, 2009 mostraram a hipótese de que a p38 MAPK (Proteína cinase ativada por mitógeno) e a JNK (Proteína cinase ativada por mitógeno 8) são moléculas-chave na regulação intracelular da inflamação mediada pela hiperatividade dos linfócitos B e T no LES.

Os autoanticorpos são produzidos pelas células B autorreativas, as quais fazem parte do repertório de células de indivíduos normais. Entretanto, no LES essas células desempenham uma funcionalidade aberrante, provavelmente resultante do seu processo de maturação defeituoso (Kytaris, 2010). Foi observado que populações de células B “naive” em pacientes com LES apresentam mais de 50% das células autorreativas antes mesmo do primeiro

encontro com antígenos. Esses achados sugerem falhas dos pontos de verificação durante a maturação desses linfócitos, as quais resultam em um maior número de células B autorreativas produzindo autoanticorpos (Yurasov *et al.*, 2005).

Em condições normais, as células B imaturas que reconhecem e são ativadas contra autoantígenos durante seu processo de maturação são negativamente selecionados pelos mecanismos de tolerância do sistema imune, prevenindo então a presença de linfócitos B autorreativos em órgãos imunes periféricos. Entretanto, células B que reconhecem antígenos próprios podem não passar por essa seleção devido a uma ativação comprometida causada por desordens no seu sistema de sinalização intracelular (Yurasov *et al.*, 2006; Kyttaris, 2010).

Uma vez que já escaparam dos mecanismos de autotolerância, os linfócitos B autorreativos, assim como as células T autorreativas, ao terem seus receptores ativados, apresentam o influxo de cálcio e a fosforilação de tirosinas aumentados (Kyttaris, 2010). Além disso, a regulação dessas células mostrou-se comprometida, uma vez que uma das vias de regulação negativa, a via do receptor FcγRIIb (um regulador da ativação do receptor de células B) está deprimida (Enyedy *et al.*, 2001; Mackay *et al.*, 2006). Devido a esse desequilíbrio entre os sinais de ativação e inibição nas células B no LES, a produção de autoanticorpos é exacerbada (Crispín *et al.*, 2010).

As células B podem influenciar a função dos linfócitos T, como por exemplo, produzindo anticorpos que se ligam às moléculas CD3 das células T, desencadeando sinais intracelulares que podem bloquear a transcrição do gene da IL-2 (Juang *et al.*, 2005), levando a uma deficiência dessa citocina, o que pode

contribuir para redução de Tregs (Lieberman e Tsokos, 2010) e para a supressão da ativação da morte de células T autorreativas (Crispín *et al.*, 2010).

Do mesmo modo, as células T também podem interferir nas células B, auxiliando-as a produzir autoanticorpos. Dessa maneira, as células B e T autorreativas contribuem em conjunto para a produção de autoanticorpos, para o desequilíbrio das citocinas e para a infiltração celular nos tecidos, levando ao estabelecimento das manifestações clínicas do LES (Kyttaris, 2010).

Uma vez que os linfócitos T reguladores estão envolvidos com o controle da tolerância periférica, pequenas desordens nessas células também podem contribuir para o desenvolvimento do LES (Chavele e Ehrenstein, 2011). Foi observada uma deficiência desse subtipo celular em pacientes com LES e uma diferença nos níveis de Tregs entre pacientes com a doença ativa e inativa. Também foram observadas anormalidades no poder de supressão dos Tregs, assim como uma resistência à supressão por parte dos outros subtipos de linfócitos (Miyara *et al.*, 2005; Valencia *et al.*, 2007; Bonelli *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008). Chavele *et al.*, 2011 também observaram uma relação inversa entre o poder de supressão dos Tregs e a atividade da doença.

A produção de autoanticorpos causa a formação de imunocomplexos, os quais se depositam nos tecidos e ativam o sistema complemento, e, caso não sejam removidos, há o desencadeamento da resposta inflamatória, causando o dano tecidual (Kyttaris, 2010). Vários componentes do complemento apresentam-se em desequilíbrio e tem seus genes associados com a susceptibilidade ao LES. Indivíduos com deficiência de C1q, C2 ou C4 mostraram um risco maior ao LES do que pessoas saudáveis. Pessoas com deficiência de C1q mostraram um risco de 90% de desenvolvimento do LES, enquanto pessoas com níveis de C2

diminuídos e total ausência de C4 mostraram um risco de 10 e 75%, respectivamente (Manderson *et al.*, 2004; Ghebrehiwet e Peerschke, 2004).

Além dos componentes da via clássica do complemento, o LES também foi associado com os componentes da via das lectinas, como por exemplo, a Lectina ligadora de manose (MBL), a qual se mostrou deficiente em pacientes com LES. A MBL, junto a outros componentes do sistema imune, atua na remoção de restos celulares e na opsonização de bactérias (Kytтарis, 2010).

Apesar de o LES geralmente ter sido estudado como uma desregulação da imunidade adaptativa envolvendo células B e T, hoje são crescentes as evidências de que a imunidade inata também está envolvida e que monócitos, células dendríticas, macrófagos e neutrófilos contribuem para a patogênese do LES (Apostolidis *et al.*, 2011).

Monócitos e macrófagos de pacientes com LES têm mostrado uma capacidade reduzida de fagocitose de material apoptótico, a qual pode contribuir com o desenvolvimento da autoimunidade (Pathak e Mohan, 2011). Kilmon *et al.*, 2007 demonstraram que macrófagos regulam a tolerância dos linfócitos B através da secreção de fatores de regulação IL-6 e CD40L, no entanto macrófagos de camundongos propensos ao desenvolvimento do lupus apresentam redução da expressão desses fatores e são incapazes de reprimir a secreção de imunoglobulinas dos linfócitos B, indicando uma possível relação dos macrófagos com a hiperatividade dos linfócitos B no LES.

Todos esses mecanismos juntos levam a um ciclo patogênico, no qual tanto imunidade inata como a adaptativa com seus diferentes componentes e células cooperam e respondem aos estímulos uma da outra para estabelecer a patogênese do LES.

2.2.3 Manifestações clínicas/laboratoriais e diagnóstico do lúpus eritematoso sistêmico

Sendo o LES uma doença sistêmica, vários órgãos e sistemas são acometidos ao mesmo tempo (Assis e Baaklini, 2009). Na figura 5, estão representados os principais órgãos e sistemas atingidos pelo desenvolvimento da doença.

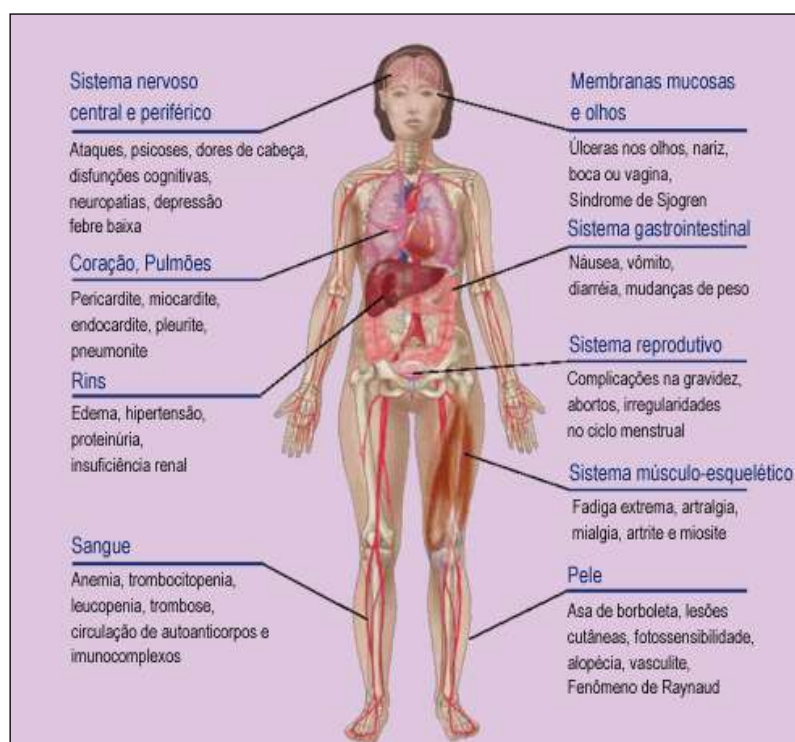


Figura 5. Manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes com LES, envolvendo os diferentes órgãos e sistemas (Fonte: www.misodor.com/LUPUS.html).

As principais manifestações clínicas ocorrem na pele e no sistema nervoso, renal, sanguíneo e imunológico. Tais manifestações clínicas podem variar em grande escala, com acometimentos concomitantes, aditivos ou sequenciais, cíclicos ou persistentes, agudos ou crônicos e com períodos de remissão,

atividade e progressão da doença relativos a órgãos e sistemas diferentes (Robinson *et al.*, 2011).

O período de remissão é muito variável e pode durar semanas, meses ou até anos; o período de atividade geralmente é uma exacerbação dos sintomas já estabelecidos; e a progressão é caracterizada pelo aparecimento de novos sintomas (Robinson *et al.*, 2011). Fatores como estresse, infecções, exposição excessiva ao sol, causas emocionais ou interrupção do tratamento são possíveis motivos para o reestabelecimento da atividade da doença (Robinson *et al.*, 2011).

O padrão inicial da doença habitualmente exhibe sintomas gerais inespecíficos, como mal-estar, fadiga, febre baixa, perda de peso e adenomegalia e costuma evoluir com manifestações cutâneas e articulares, alterações hematológicas e sorológicas (Assis e Baaklini, 2009).

As manifestações cutâneas levam a um potencial diagnóstico do Lupus através de quatro critérios: rash malar, fotossensibilidade, rash discoide e alopecia (Assis e Baaklini, 2009) (Figura 6).

Pacientes com LES também podem apresentar manifestações vasculares, como por exemplo, vasculites cutâneas, as quais são observadas principalmente em vasos de pequeno calibre. A vasculite em pacientes com LES é mediada tanto pela deposição de imunocomplexos como pela ligação direta de anticorpos aos componentes celulares e, conseqüentemente, pela ativação do sistema complemento e inflamatório (Uva *et al.*, 2012).



Figura 6. Manifestações cutâneas do LES: A. Rash malar. B. Fotossensibilidade. C. Rash discoide. (Fonte: Uva *et al.*, 2012).

Como uma das manifestações vasculares dos pacientes com LES, há também o Fenômeno de Raynaud (Figura 7), o qual se caracteriza por uma resposta vascular exagerada a baixas temperaturas e ao estresse emocional. Esse fenômeno é caracterizado pela mudança de cor nas pontas dos dedos, causada pela vasoconstrição anormal das arteríolas das digitais, sendo esse um processo reversível (Uva *et al.*, 2012).



Figura 7. Alterações causadas pelo Fenômeno de Raynaud (Fonte: www.med.umich.edu)

Artralgia, artrite e osteonecrose são as principais manifestações musculoesqueléticas no LES (Cojocaru *et al.*, 2011). Geralmente, essas manifestações são não-erosivas, assimétricas, migratórias e moderadamente dolorosas (Goh *et al.*, 2012) (Figura 8).



Figura 8. Artrite desencadeada pelo LES (Fonte: Ribeiro *et al.*, 2011)

O envolvimento renal ocorre pelo menos em metade dos pacientes em algum momento do desenvolvimento da doença, contribuindo de forma significativa para a morbidade e mortalidade da doença. Em torno de 10% dos pacientes evoluem para insuficiência renal crônica em cinco anos (Assis e Baaklini, 2009).

O LES também pode acometer o sistema cardiovascular em 58 a 77% dos pacientes em algum momento do seu curso, sendo que raramente ocorre como primeira manifestação da doença ou isoladamente (Goh *et al.*, 2012). A pericardite é uma das manifestações cardíacas do LES mais comum, inclusive sendo um dos critérios de inclusão usados para o diagnóstico da doença na classificação do Colegiado Americano de Reumatologia (ACR) (Tan *et al.*, 1982; Gladman *et al.* 1996; Hochberg, 1997).

O envolvimento do sistema nervoso central também é uma das principais causas de mortalidade e morbidade em pacientes com LES (Goh *et al.*, 2012). Dores de cabeça e transtornos de humor são as principais manifestações neurológicas relatadas (Cojocar *et al.*, 2011).

O envolvimento do sistema respiratório no LES é bastante comum, entre 40 a 57% dos pacientes apresentam sintomas de dispneia e pouca tolerância a exercícios físicos (Lalani *et al.*, 2004).

Alguns sintomas gastrointestinais secundários ao LES e como efeitos adversos do tratamento da doença também são comuns entre os pacientes: ulcerações orais é uma manifestação clínica comum da doença, sendo inclusive um dos critérios determinados pelo ACR (Tan *et al.*, 1982; Gladman *et al.* 1996; Hochberg, 1997) para o diagnóstico da doença (Cojocar *et al.*, 2011).

Ao longo da evolução do LES, mais da metade dos casos desenvolverão manifestações hematológicas (Assis e Baaklini, 2009). O lupus em atividade é frequentemente caracterizado por anemia, leucopenia, linfopenia e trombocitopenia, provavelmente pelos efeitos não específicos da inflamação sobre a função da medula óssea, assim como pela produção de autoanticorpos específicos para os elementos celulares (Sasidharan *et al.* 2012).

Como uma das principais características do LES, há a formação de autoanticorpos contra uma grande variedade de componentes celulares (Arbuckle *et al.*, 2003; Kyttaris, 2010). Um dos mais frequentes é o anticorpo antiDNA, o qual pode ser contra o DNA de dupla fita ou contra o DNA de fita simples, podendo estar presente em 70 a 80% dos pacientes com LES. Outro exemplo são os anticorpos antinucleossomais, os quais se dirigem contra proteínas que compõem os nucleossomos (Duarte, 2005; Vargas e Romano, 2009).

Há também os anticorpos antiSm e antiRNP, dirigidos contra os polipeptídeos envolvidos na síntese de RNA Smith e RNP, respectivamente. Também podem ser encontrados os anticorpos antiRo/SSA e antiLa/SSB, os quais são anticorpos contra as ribonucleoproteínas (Duarte, 2005; Vargas e Romano, 2009).

Um dos principais autoanticorpos no LES é o anticorpo antifosfolípideo. Esse anticorpo age diretamente contra os componentes da membrana da célula, interferindo no processo de coagulação e na função das células endoteliais, tendo como consequência um aumento na expressão de moléculas de adesão na superfície das células e a indução da produção de fator tissular, causando agregação plaquetária e a formação de trombos (Ruiz-Irastorza *et al.*, 2010). Esses eventos caracterizam a Síndrome do Anticorpo Antifosfolípideo, a qual muitas vezes é responsável por abortos espontâneos em gestantes com essa síndrome (Ruiz-Irastorza *et al.*, 2010).

O aparecimento desses autoanticorpos pode preceder os sintomas clínicos por vários anos e o seu repertório aumentar de maneira progressiva (Kyttaris, 2010). Essas imunoglobulinas participam da deposição de imunocomplexos, causando a ativação do sistema complemento e o aumento da atividade inflamatória por meio da liberação de citocinas pró-inflamatórias e do influxo de células mononucleares e neutrófilos (Li e Isenberg, 2006).

Um dos principais testes utilizados para o rastreamento dos autoanticorpos é o teste do Fator Antinuclear (FAN), o qual pesquisa os anticorpos antinucleares (ANA) encontrados no LES, mas também pode detectar a presença de autoanticorpos contra elementos do citoplasma e do nucléolo da célula. No LES, o FAN é positivo em quase 100% dos pacientes e, além de indicar a presença dos

autoanticorpos, também tem caráter semiquantitativo. Esse teste pode sugerir quais as possíveis especificidades de autoanticorpos presentes e indicar as próximas etapas da investigação laboratorial dos autoanticorpos envolvidos (Vargas e Romano, 2009).

O diagnóstico do lupus é estabelecido através dos critérios de classificação do ACR (Tan *et al.*, 1982; Gladman *et al.* 1996; Hochberg, 1997), que se baseia na presença de pelo menos 4 entre os 11 critérios mostrados na Tabela 3. A presença desses critérios pode diagnosticar o paciente como portador da doença com 95% de especificidade e 85% de sensibilidade (Louis e Fernandes, 2001).

Tabela 3. Critérios para diagnóstico do LES de acordo com o Colegiado Americano de Reumatologia (Tan *et al.*, 1982; Gladman *et al.* 1996; Hochberg, 1997).

Critério	Definição
1. Rash malar	Eritema fixo, plano ou elevado, sobre a região malar.
2. Rash discoid	Manchas eritematosas elevadas com placas ceratóticas aderentes. Cicatrizes atróficas podem ocorrer em lesões antigas.
3. Fotossensibilidade	Rash resultante de reação incomum à luz do sol, por história do paciente ou observação do médico.
4. Úlceras orais	Úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente dolorosas.
5. Artrite	Artrite não erosiva, envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizada por sensibilidade, edema ou derrame articular.
6. Serosite	Pleurite, história de dor pleurítica, atrito auscultado por um médico ou evidência de derrame pleural; pericardite documentada por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico.
7. Doença renal	Proteinúria persistente, maior que 0,5 g/24h ou maior do que 3+ se não é realizada a quantificação; cilindros celulares: hemáticos, granulares, tubulares ou mistos.

Continuação Tabela 3. Critérios para diagnóstico do LES de acordo com o Colegiado Americano de Reumatologia (ACR).

8. Doença neurológica	Convulsões na ausência de drogas ou distúrbios metabólicos que possam desencadear a crise; psicose na ausência de drogas ou distúrbios metabólicos que possam desencadear a crise.
9. Alterações hematológicas	Anemia hemolítica com reticulocitose; leucopenia caracterizada por menos de 4000 leucócitos/mm ³ em duas ou mais ocasiões; linfopenia caracterizada por menos de 1500 linfócitos/mm ³ em duas ou mais ocasiões; trombocitopenia caracterizada por menos de 100.000 plaquetas/mm ³ na ausência de drogas plaquetopênicas.
10. Alterações imunológicas	Anticorpo anti-DNA nativo positivo; anticorpo anti-Sm positivo; presença de anticorpo antifosfolípido, baseado em níveis séricos anormais de anticardiolipina IgG ou IgM; anticoagulante lúpico positivo por um método padrão; teste sorológico positivo para sífilis por pelo menos 6 meses e confirmado por FTA-ABS negativo.
11. Anticorpo antinuclear (FAN)	Títulos anormais por imunofluorescência ou teste equivalente em qualquer momento na ausência de drogas conhecidas como “indutoras de lupus”.

2.2.4 Fatores ambientais do lupus eritematoso sistêmico

Alguns fatores ambientais são sabidamente importantes no desencadeamento do LES, assim como na sua severidade e manifestações (Zandman-Goddard *et al.*, 2012).

A luz ultravioleta apresenta papel prejudicial na exacerbação da doença. Quando os queratinócitos são expostos à luz ultravioleta, o seu DNA sofre danos, causando a apoptose da célula e, conseqüentemente, liberação do material nuclear (Cooper *et al.*, 2008). Nos pacientes com LES, esse material não é removido de forma adequada, o que desencadeia uma resposta inflamatória e,

como consequência, pode influenciar no aparecimento das manifestações cutâneas desses pacientes (Cooper *et al.*, 2008).

Infecções virais também são consideradas possíveis desencadeadoras do LES, devido ao mimetismo molecular entre determinados vírus e proteínas próprias. Como exemplo, a proteína EBNA-1 do Epstein-Barr vírus, a qual apresenta reação cruzada com o autoantígeno Ro, um dos principais alvos da resposta imunológica no LES (Zandman-Goddard *et al.*, 2009; Draborg *et al.*, 2012).

Outro fator ambiental considerado indutor do LES é a exposição a xenobióticos orgânicos e compostos inorgânicos. Um exemplo é a hidrazina, um composto amplamente usado na agricultura e na indústria (Hess, 2002). O uso de drogas como, por exemplo, a hidralazina e a procainamida também mostrou ter impacto no desenvolvimento do LES. Essas drogas inibem a metilação do DNA, o que pode causar a diminuição da produção de citocinas por células T CD4⁺ e a hiperprodução de IgG por determinados tipos de linfócitos B, desordenando o sistema imune e, conseqüentemente, induzindo o desenvolvimento do LES em um indivíduo geneticamente predisposto (Crispín *et al.*, 2010).

O tabagismo também mostrou estar envolvido com o risco ao LES. Além dos tabagistas crônicos apresentarem elevados títulos de anticorpos anti-DNA dupla fita (Arnson *et al.*, 2010), o fumo está envolvido na hipóxia tecidual, necrose celular mediada por toxinas, liberação de antígenos intracelulares, eliminação inadequada de restos celulares e aumento de células B autorreativas (Agmon-Levin *et al.*, 2009).

O papel dos hormônios femininos no desencadeamento do LES já está bem estabelecido. Fontes exógenas de estrógeno, tais como contraceptivos orais,

terapia de reposição hormonal e preparação para fertilização *in vitro* e estrógenos presentes em medicina alternativa e pesticidas, mostram ter um papel no desenvolvimento e exacerbação da doença (Peeva e Zouali, 2005; Klumb *et al.*, 2010). A administração de moduladores do receptor de estrógeno, bloqueando os efeitos do hormônio, mostrou ter um impacto benéfico na atividade da doença em camundongos propensos ao lupus (Rubtsov *et al.*, 2010).

2.3 FATORES GENÉTICOS DA ARTRITE REUMATOIDE E DO LUPUS ERYTEMATOSO SISTÊMICO

Fatores genéticos estão associados ao desenvolvimento tanto da AR como do LES. Evidências mostram que um histórico familiar positivo aumenta o risco de AR aproximadamente em 3 a 5 vezes (Silman *et al.*, 1993; Silman *et al.*, 2002) e que a prevalência do LES em parentes de primeiro grau é cerca de 10 vezes maior do que em grupos controles (Li e Isenberg, 2006).

A identificação de fatores genéticos para essas doenças é dificultada devido à heterogeneidade genética e baixa penetrância alélica, assim como pela interação entre os genes e interação gene-ambiente. Entretanto, durante a última década estudos de associação e estudos em larga escala do genoma (GWAS) tem identificado diversos genes associados ao desenvolvimento e progressão da AR e do LES, sendo a grande maioria envolvida com a resposta imune (Delgado-Vega *et al.*, 2010; Messemaker *et al.*, 2015; Saeed M, 2017). As figuras 9 e 10 trazem um panorama geral dos principais genes associados ao desenvolvimento do LES e da AR, respectivamente.

Imunidade Inata	APOPTOSE		CITOCINAS		INTERFERON		TRANSCRIÇÃO		
	<i>AFF1</i>	22291604	<i>IL10</i>	19838195	<i>IFIH1</i>	22046141	<i>HAND1</i>	23740238	<i>MYO18B</i> 23740238
	<i>ATG5</i>	21622776	<i>IL21</i>	21425124	<i>IRF3</i>	25130328	<i>HIPK1</i>	23740238	<i>RASGRP3</i> 23249952
	<i>ATG7</i>	21622776	<i>IL8</i>	21179067	<i>IRF5</i>	24697319	<i>IKBKE</i>	21179067	<i>SOS1</i> 23740238
	<i>PDCD1</i>	19220647	<i>SPP1</i>	15692970	<i>IRF7</i>	21360504	<i>IRAK1</i>	19329491	<i>STAT4</i> 24697319
	<i>REL</i>	21905002	<i>IL12A</i>	26502338	<i>IRF8</i>	22046141	<i>JAZF1</i>	23740937	<i>TRAF6</i> 22231568
	<i>TREX1</i>	17660818	<i>SOCs1</i>	26502338	<i>PRDM1</i>	19838195	<i>MECP2</i>	22904263	<i>TNIP1</i> 23249952
	<i>RAD51B</i>	26502338			<i>TYK2</i>	22046141	<i>MIR146a</i>	21738483	<i>TCF7</i> 26502338
Imunidade Adaptativa	SINALIZAÇÃO DE CÉLULAS B		SINALIZAÇÃO DE CÉLULAS T		SINALIZAÇÃO CELULAR		APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS		
	<i>BANK1</i>	21408207	<i>CD44</i>	21194677	<i>SPRED2</i>	26502338	<i>ERBB3</i>	20962850	
	<i>BLK</i>	21480188	<i>CTLA4</i>	20962850	<i>NADSYN1</i>	26502338	<i>ICA1</i>	20962850	
	<i>CD40</i>	21914625	<i>PTPN22</i>	21078766	<i>SH2B3</i>	26502338			
	<i>CSK</i>	23042117	<i>TNFAIP3</i>	21905002	<i>CIITA</i>	26502338			
	<i>LYN</i>	19369946	<i>TNFSF4</i>	21905002	<i>SLC5A11</i>	24925725			
	<i>PRKCB</i>	21134959	<i>TRAF1</i>	21905002					
	<i>IKZF1</i>	23249952	<i>ELF1</i>	21044949					
	<i>IKZF2</i>	26502338	<i>ETS1</i>	23249952					
Imuno-complexos	<i>IKZF3</i>	22464253							
	FAGOCITOSE		COMPLEMENTO		ADESÃO CELULAR				
	<i>CRP</i>	24574329	<i>CFB</i>	21792837	<i>TBL1XR1</i>	23740238			
	<i>FCGR2A</i>	15895258	<i>CR2</i>	25180293	<i>PECAM-1</i>	25201689			
	<i>FCGR2B</i>	16227149	<i>CR5</i>	25167769	<i>ARHGAP26</i>	23740238			
	<i>FCGR3A</i>	17596285	<i>CSMD1</i>	23740238	<i>DIAPH3</i>	23740238			
	<i>FCGR3B</i>	22551723	<i>MBL2</i>	21792837	<i>PDGFRA</i>	24925725			
	<i>ITGAM</i>	18204098			<i>HAS2</i>	24925725			
	<i>ITGAX</i>	18204098							
	<i>NCF2</i>	22046141							

Figura 9. Genes associados ao desenvolvimento do LES com suas respectivas funções (Fonte: adaptada de Saeed M, 2017).

A região cromossômica 6p21, a qual compreende o complexo de histocompatibilidade humano (HLA), é o fator genético mais bem estabelecido como predisponente ao desenvolvimento do LES e da AR, principalmente os genes HLA de classe II (Okada *et al.*, 2014; Ghodke-Puranik Y *et al.*, 2015; Viatte *et al.*, 2015).

Estudos em diferentes populações mostram a associação de alelos *HLA-DRB1* (*DRB1*1501* e *DRB1*0301*) com o LES. Além disso, esses alelos mostraram-se associados com a produção de subtipos de autoanticorpos no LES. Por exemplo, *HLA-DRB1*03:01* não apenas influencia a susceptibilidade ao LES como também está associado com a produção dos anticorpos anti-Ro e anti-La

(Morris *et al.*, 2014). Para o desenvolvimento da AR, estudos mostram a forte influência genética dos alelos DRB*0401, 0404, 0405, 0408, 0101, 0102, 1001 e DRB*09, sendo o DRB*0401 e 0405 os alelos com maior associação (OR = 3,3 e 3,8, respectivamente) (Fernando *et al.*, 2008; Chibnik *et al.*, 2011).

A posição 70 a 74 da terceira região hipervariável da cadeia DR β 1 codificada pelos alelos HLA-DRB1 associados com a AR sempre apresenta uma sequência conservada de aminoácidos QKRAA, QRRAA ou RRRAA (Q = glutamina, K = lisina, R = arginina e A = alanina). Essa sequência de aminoácidos é denominada epítipo compartilhado (EC). Um indivíduo homozigoto para alelos DRB1-EC tem um aumento do risco de desenvolvimento da AR com uma OR = 11,97 (Gregersen *et al.*, 1987; Huizinga *et al.*, 2005; Perricone *et al.*, 2011). Acredita-se que a presença do EC influencie a interação entre o peptídeo a ser apresentado às células T e o HLA. Além disso, proteínas citrulinadas são capazes de se acoplar nas moléculas do HLA-EC, induzindo as células B à produção de ACPA. Alelos com EC também estão associados a formas mais graves da AR e a manifestações extra-articulares (Gregersen *et al.*, 1987; Weyand e Goronzy, 1992; van der Helm-van Mil *et al.*, 2007; James *et al.*, 2010).

Vários outros genes da imunidade adaptativa, envolvidos com a sinalização das células B e T, assim como genes da imunidade inata envolvidos com a apoptose e produção de citocinas também se mostraram envolvidos com o desenvolvimento da AR e do LES. Genes com função na formação de imunocomplexos, através da fagocitose, adesão celular e produção do complemento, também parecem ter envolvimento importante no desenvolvimento dessas doenças.

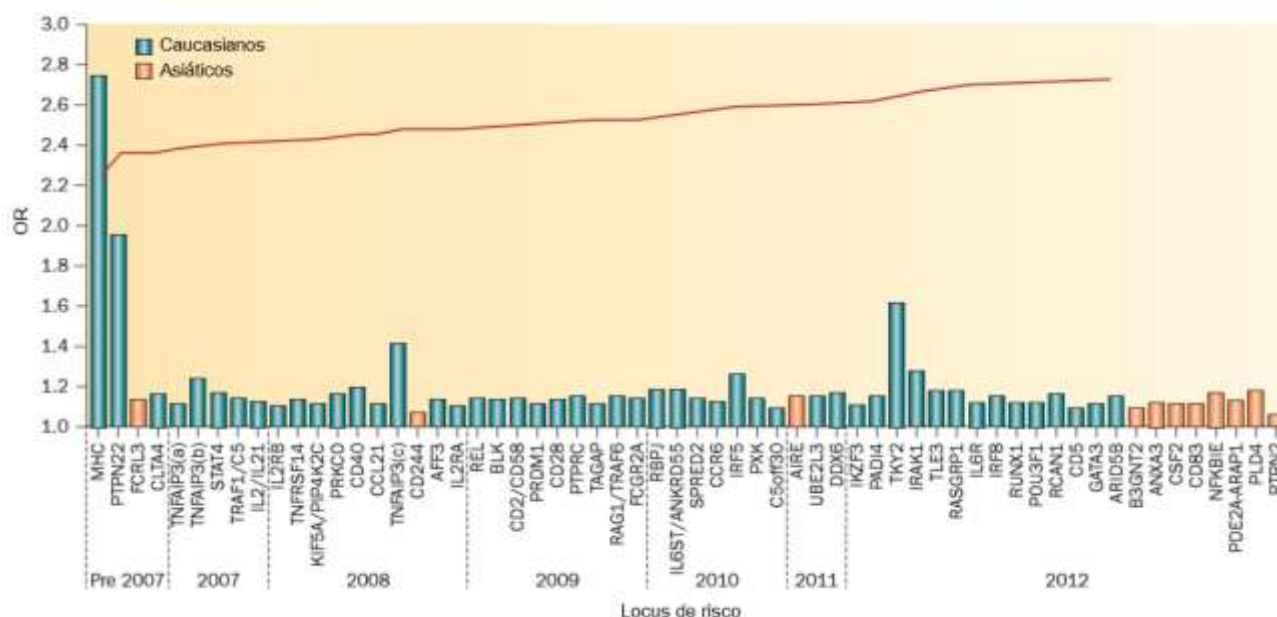


Figura 10. Genes associados à AR ao longo dos anos. As barras em azul indicam os genes associados em caucasianos, enquanto os loci validados em população asiática são vistos nas barras em laranja (Fonte: adaptado de Viatte *et al.*, 2013).

Um dos genes mais importantes identificados até o momento é o *PTPN22* (Proteína tirosina fosfatase, não-receptor tipo 22), o qual codifica a tirosina fosfatase Lyp, um regulador negativo da transdução de sinal de ativação das células T (Rieck *et al.*, 2007). O principal alelo de risco tanto para o LES como para a AR é um polimorfismo de base única não sinônimo (rs2476601, +1858 C>T) que codifica a substituição de uma arginina por um triptofano na posição 620 do peptídeo (Begovich *et al.*, 2004; Gregersen e Olsson, 2009; Salama *et al.*, 2014; Elshazli e Settin, 2015).

Evidências mostram que esse polimorfismo causa um ganho de função, aumentando o seu efeito inibitório na ativação das células T durante o desenvolvimento do timo, o que pode induzir a autoimunidade através de alterações na seleção de linfócitos autorreativos e redução da atividade e do número de Tregs (Rieck *et al.*, 2007).

O gene que codifica a proteína STAT4 (sinal de transdução e ativação do fator de transcrição 4) também tem sido associado tanto com a AR como com o LES em diferentes populações. A STAT4 apresenta importante papel na resposta imune induzida pelo IFN tipo 1 e outras citocinas, a qual promove a resposta Th1 e Th17 (Korman *et al.*, 2008). Em diferentes estudos, o polimorfismo rs7574865, presente no terceiro íntron do *STAT4*, mostrou-se associado com um maior risco de desenvolvimento ao LES e com uma maior sensibilidade para a sinalização pelo IFN- α (Kariuki *et al.*, 2009). O *STAT4* também foi associado com o desenvolvimento da AR em populações asiáticas, europeias e africanas (Elshazli e Settin, 2015; Gu *et al.*, 2015).

O gene *CTLA-4* (Antígeno de linfócito T citotóxico 4) também vem sendo descrito como um dos mais importantes genes de susceptibilidade a doenças autoimunes. A proteína codificada por esse gene é expressa na superfície de linfócitos T e apresenta função regulatória inibitória sobre essas células (Teff *et al.*, 2006). A sinalização da CTLA-4 tem papel fundamental na supressão da proliferação de linfócitos autorreativos e assim na manutenção da autotolerância (Chistiakov *et al.*, 2003). Os polimorfismos do *CTLA-4* mais estudados e considerados como associados à AR e ao LES em diferentes populações são T>C na posição -1722, C>T na posição -138 e A>G na posição +49 do éxon 1 (Ulker *et al.*, 2009; Taha khalaf *et al.*, 2011; Luterek-Puszyńska *et al.*, 2016; Fattah *et al.*, 2017).

Variações nos genes dos fatores reguladores de interferon (*IRFs*) também foram associadas à susceptibilidade ao LES e AR. Estudos em diversas etnias mostraram a associação de diferentes polimorfismos no gene *IRF5* (Fator regulador de interferon 5) com o desenvolvimento de ambas doenças (Niewold *et*

al., 2008; Cham *et al.*, 2012; Negi *et al.*, 2014; Ruiz-Larrañaga *et al.*, 2016). Também foi observada a associação do *IRF5* com a produção de autoanticorpos anti-Ro, anti-La e anti-DNA de fita dupla em pacientes com LES (Niewold *et al.*, 2008). O *IRF5* codifica o principal fator de transcrição na via do IFN tipo I, regulando genes dependentes do IFN, citocinas inflamatórias e genes envolvidos na apoptose (Kelly *et al.*, 2008; Sigurdsson *et al.*, 2008; Siu *et al.*, 2008). Polimorfismos nos genes *IRF7* e *IRF8* também estão associados ao desenvolvimento do LES em diferentes populações e correlacionados com o aumento dos níveis de IFN (Ghodke-Puranik *et al.*, 2015).

Outros genes associados ao LES e à AR são os genes do Receptor Fc gama (*FCGR*) *2A*, *FCGR3A*, *FCGR2B* e *FCGR3B* que codificam os receptores Fcγ, os quais reconhecem imunocomplexos e estão envolvidos na resposta à presença de anticorpos (Chen *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Saeed *et al.*, 2017). Diversas variantes funcionais nesses genes foram identificadas como fatores de risco para o LES e AR, tais como: o polimorfismo não sinônimo rs1801274 do *FCGR2A*, o qual foi associado com uma baixa afinidade desse receptor a partículas opsonizadas por IgG2 e com a redução da remoção de imunocomplexos (Deng e Tsao, 2010; Lee *et al.*, 2015); variantes no *FCGR3A* (rs396991) que alteram a afinidade de ligação desse receptor a imunocomplexos que contenha IgG1, IgG3 ou IgG4 (Magnusson *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2015); o polimorfismo não sinônimo (I232T) c.695T>C, no domínio transmembrânico do *FCGR2B* que altera a função inibitória do receptor FcγRIIb de células B, causando alterações na inibição da ativação dessas células e, como consequência, contribuindo com a autoimunidade (Kyogoku *et al.*, 2002; Siriboonrit *et al.*, 2003; Chu *et al.*, 2004); e o baixo número de cópias do *FCGR3B* que é frequente em

pacientes com LES e parece estar associado com uma diminuição da expressão do receptor e da remoção dos imunocomplexos (Fanciulli *et al.*, 2007; Willcocks *et al.*, 2008).

Alguns genes foram até o momento associados especificamente ao LES ou a AR. Por exemplo, o gene *TREX1* (Exonuclease de reparação 1), que codifica a principal DNA exonuclease 3'-5'. Essa enzima, além de revisar a atividade da DNA polimerase, também atua degradando o DNA durante a apoptose minimizando a reatividade autoimune ao DNA próprio (Stetson *et al.*, 2008). Um estudo de associação entre esse gene e pacientes com LES do Reino Unido, Alemanha e Finlândia mostrou que mutações no *TREX1* estavam presentes em pacientes com LES e ausentes em indivíduos saudáveis (Lee-Kirsch *et al.*, 2007).

Um importante risco genético na AR são polimorfismos presentes nos genes das enzimas PADI, as quais convertem resíduos de arginina em citrulina, estimulando dessa forma a produção de ACPA. Polimorfismos nos genes *PADI2* (rs2235926, OR = 1,71; e rs2057094, OR = 1,36) mostraram associação com o desenvolvimento da AR. Um aumento da expressão do *PADI2* também foi observado em pacientes com AR comparados a pacientes com osteoartrite e espondilite anquilosante (Chang *et al.*, 2013).

O gene *PADI4* também mostrou contribuir com o desenvolvimento da AR (OR = 1,12). Numa população japonesa, foi observada a associação do *PADI4* com a progressão de danos radiológicos na articulação de pacientes com AR (Suzuki *et al.*, 2003; Plenge *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2013).

Na última década, vários outros polimorfismos foram estudados em diferentes genes e associados com a susceptibilidade à AR e ao LES, como por exemplo, os genes *TRAF1* (Fator 1 associado ao receptor de TNF) (Plenge *et al.*,

2007; Panoulas *et al.*, 2009; Canhão *et al.*, 2015; Saeed M, 2017), *TNFAIP3* (do inglês, tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 (Graham *et al.*, 2008; Orozco *et al.*, 2009), *PRDM1* (Domínio contendo 1 PR, com domínio ZNF) (Gateva *et al.*, 2009; Han *et al.*, 2009; Viatte *et al.*, 2013), *VDR* (Receptor de vitamina D) (de Azevêdo Silva *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2016) e *ETS1* (V-ets vírus da eritroblastose homólogo 1 do oncogene E2) (Han *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010).

2.4 INFLAMASSOMA

Um dos papéis do sistema imune é reconhecer e defender o organismo de invasores. O reconhecimento desses corpos estranhos pela imunidade inata é mediado por um número limitado de receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs). Esses PRRs reconhecem estruturas conservadas de microrganismos, conhecidas como padrões moleculares associados ao patógeno (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs). Exemplos de PAMPs são os lipopolissacarídeos e peptideoglicanos bacterianos e o RNA viral (Chen e Nunez, 2010; Schroder e Tschopp, 2010; Takeuchi e Akira, 2010).

A ativação dos PRRs pelos PAMPs desencadeia uma resposta inflamatória capaz de ativar a imunidade inata, assim como a imunidade adaptativa no caso dos mamíferos. Os PRRs também são ativados por sinais de perigo não-microbianos (Danger Associated Molecular Patterns, DAMPs), tais como DNA, RNA ou ácido úrico. Esses DAMPs normalmente encontram-se em determinados compartimentos celulares impedidos de ativar o inflamassoma, porém após o dano celular podem passar a ocupar diferentes localizações e consequentemente induzir a ativação do inflamassoma (Chen e Nunez, 2010; Schroder e Tschopp, 2010; Takeuchi e Akira, 2010).

PRRs compreendem uma classe de receptores de membrana, os receptores “Toll-like” (TLR), e duas classes de receptores citoplasmáticos, os receptores “NOD-like” (NLR) e os receptores “retinoic acid-inducible gene I-like” (RLRs) (Schroder e Tschopp , 2010). Os NLRs associados com outras proteínas formam complexos citoplasmáticos, conhecidos como inflamassomas, os quais mediam a ativação da caspase-1. As caspases são produzidas nas células como zimógenos e precisam ser proteoliticamente processadas para sua ativação. Quando ativa, a caspase-1 é responsável pela maturação da pro-IL1 β e pro-IL18, citocinas conhecidas como pro-inflamatórias (Shaw *et al.*, 2011; Zambetti *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2013; Lamkanfi *et al.*, 2014).

Os inflamassomas mais estudados são: o NLRP1 (do inglês, NLR, pyrin domain containing 1), o NLRP3 (do inglês, NLR, pyrin domain containing 3), o NLRC4 (do inglês, NLR, CARD domain containing 4) e o AIM2 (do inglês, absent in melanoma 2). Cada tipo de complexo molecular é capaz de reconhecer diferentes PAMPs e DAMPs, amplificando o sinal de estresse reconhecido pelo sistema imune (Schroder e Tschopp , 2010) (Figura 11).

Um inflamassoma típico consiste de uma proteína NLR como proteína reconhecedora, uma ou mais proteína adaptadora, como por exemplo a ASC (do inglês, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), e uma ou mais caspase, como molécula efetora (Neven *et al.*, 2008; Shaw *et al.*, 2011; Zambetti *et al.*, 2012; Vanaja *et al.*, 2015). A ASC é uma molécula bipartida com um domínio PYD e um domínio CARD. Após o reconhecimento de ligantes, os NLRs são ativados e expõem seus domínios efetores, CARD e PYD, os quais através de interações homotípicas recrutam moléculas que também contenham domínios CARD e PYD, aproximando-as e, conseqüentemente, ativando-as. Uma

vez ativada, a ASC cliva a pro-caspase-1 em caspase-1, a qual irá maturar a pro-IL1 β e pro-IL18 em IL-1 β e IL-18, respectivamente (Neven *et al.*, 2008; Shaw *et al.*, 2011; Zambetti *et al.*, 2012; Vanaja *et al.*, 2015) (Figura 12).

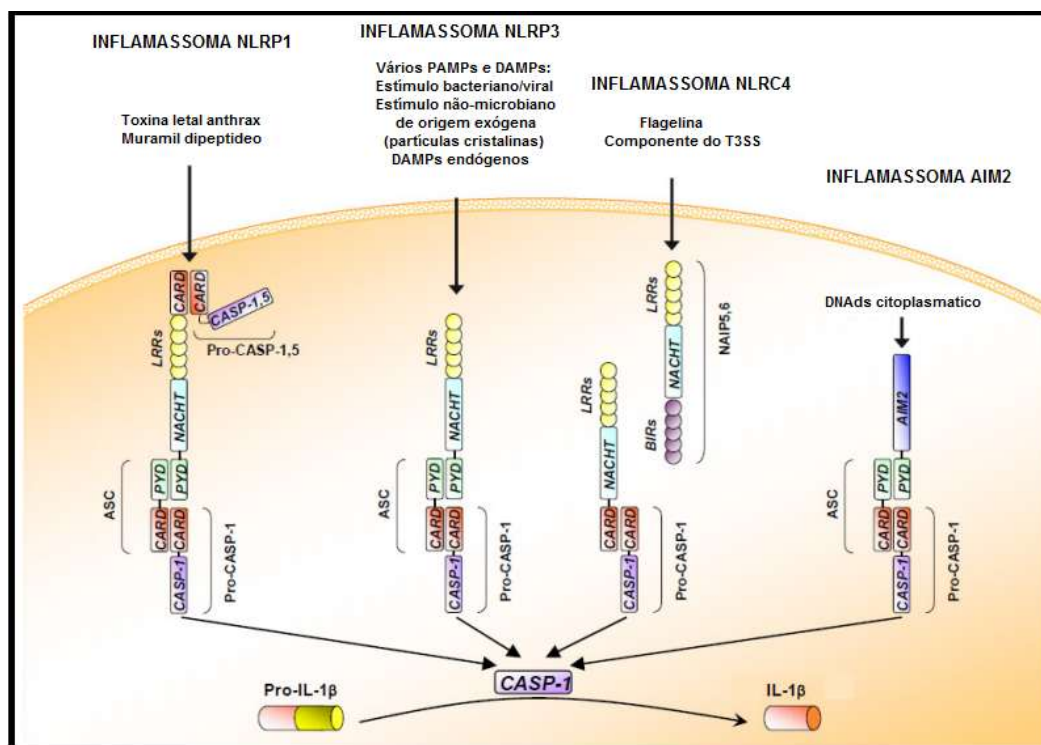


Figura 11. Diferentes tipos de inflamassoma já descritos, os quais são ativados por diferentes PAMPs e DAMPs (Fonte: adaptado de Contassot *et al.*, 2012).

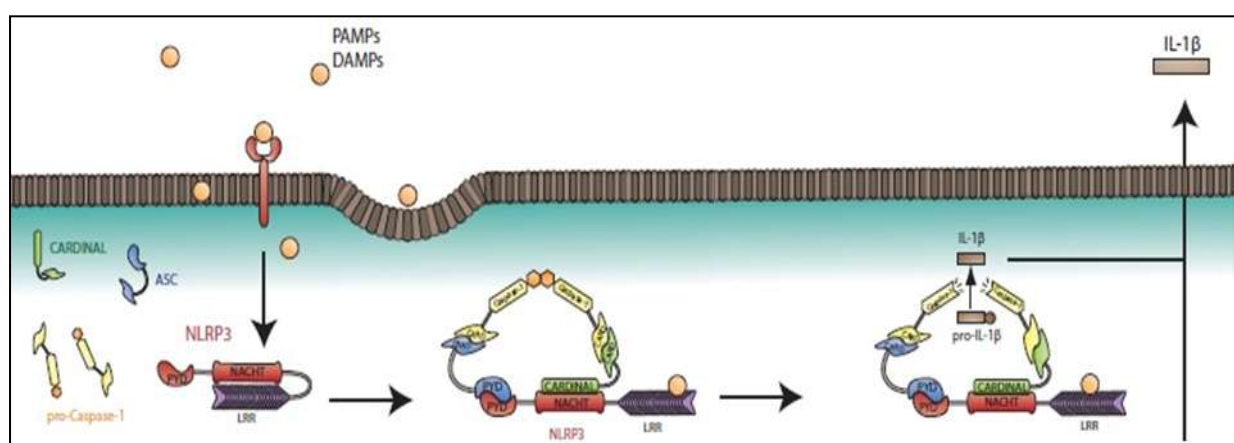


Figura 12. Inflamassoma NLRP3. Processamento da pro-IL-1 β após estímulo por PAMPs e DAMPs (Fonte: adaptado de Kuiper, 2009).

A IL-1 β é capaz de promover a produção de citocinas através das células dendríticas; atuar sobre os linfócitos, regulando a expressão do receptor de IL-2, prolongando a sobrevivência das células T; e induzir a expressão do CD40 e seu receptor e assim estimular a interação entre células B e T (Shaw *et al.*, 2011). A produção de IL-1 β é essencial para a defesa do organismo, uma vez que uma inflamação ineficiente pode levar a infecções persistentes. Entretanto, uma inflamação descontrolada também pode causar danos ao organismo, levando ao desenvolvimento de distúrbios inflamatórios crônicos e sistêmicos.

O inflamassoma tem sido associado a uma variedade de doenças autoinflamatórias e autoimunes, bem como a distúrbios neurodegenerativos, tais como esclerose múltipla e doença de Parkinson e Alzheimer, e também doenças metabólicas, como aterosclerose, diabetes tipo 2 e obesidade (Lamkanfi e Dixit, 2012; Strowig *et al.*, 2012).

2.5 ENVOLVIMENTO DO INFLAMASSOMA COM A ARTRITE REUMATOIDE E O LUPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Estudos em modelo murino mostram o envolvimento do inflamassoma na AR. Vande Walle *et al.*, 2014 observaram que mutações no A20/Tnfrsf3, as quais predisõem os camundongos ao desenvolvimento da AR, resultam em uma ativação exacerbada do inflamassoma. Também foi observado no estudo que a ausência de uma NLRP3 funcional influencia em uma melhora da doença. Na artrite induzida por colágeno, a inibição do NLRP1 mostrou-se protetora ao desenvolvimento da doença (Li *et al.*, 2014), enquanto uma ASC funcional é requisito para a atividade da AR (Ippagunta *et al.*, 2010). Em estudos com humanos, componentes do inflamassoma NLRP3 apresentaram níveis elevados

em células mononucleares periféricas de pacientes com AR não tratados. Também foram observados níveis séricos aumentados de IL-18 e pro-caspase-1 em pacientes com AR (Mathews *et al.*, 2014).

Em sangue total de pacientes com AR em atividade, foi observada elevada expressão basal intracelular das proteínas NLRP3, ASC, caspase-1 ativa e pro-IL-1 β . Após o estímulo *in vitro* com PAMPs e DAMPs, também se observou uma maior expressão de NLRP3 e caspase-1 ativa, assim como uma maior secreção de IL-1 β (Choulaki *et al.*, 2015). Em macrófagos de pacientes com LES, observou-se uma produção aumentada de IL-1 β induzida por ATP. Uma expressão aumentada também foi observada do RNAm do gene *NLRP3* em macrófagos não estimulados de pacientes com LES do sexo feminino (Yang *et al.*, 2015).

O NLRP3 e a caspase-1 também se mostraram aumentadas em biopsias de nefrite de pacientes com LES. Acredita-se que a deposição de imunocomplexos promova a ativação do inflamassoma, contribuindo para a inflamação e então dano tecidual (Kahlenberg *et al.*, 2011). Interessantemente, o tratamento com cloroquina, amplamente usado nos pacientes com LES, mostrou reprimir a expressão exacerbada do NLRP3 durante a progressão da doença (Glinsky *et al.*, 2008).

Camundongos caspase 1^{-/-} mostraram ser resistentes ao desenvolvimento de lupus em modelo induzido por pristano. Comparados a camundongos selvagens, os deficientes em caspase apresentaram redução significativa nos títulos de anticorpos anti-DNA de fita dupla e anti-RNP e dos níveis de IFN tipo 1 e mostraram proteção contra a deposição de imunocomplexos e inflamação renal (Kahlenberg *et al.*, 2014).

Diferentes estudos mostraram a correlação entre os níveis elevados de IL-18 e IL-1 β com o desenvolvimento de alterações renais nos pacientes com LES, assim como com a severidade e atividade da doença, respectivamente (Aringer e Smolen, 2005; Favilli *et al.*, 2009; Kahlenberg *et al.*, 2011; Hatef *et al.*, 2013; Umare *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2016).

Estudos de associação e expressão gênica têm sido realizados entre a AR e o LES e componentes do inflamassoma. Polimorfismos e uma transcrição aumentada do gene *NLRP1* foram associados ao desenvolvimento da AR e do LES. O *NLRP1*, localizado no braço curto do cromossomo 17 na região 13.2 (17p13.2), codifica uma proteína apoptótica com um domínio de recrutamento para caspase (CARD) e um motivo N-terminal PYD envolvido na interação proteína-proteína, possivelmente com a ASC. A *NLRP1* interage com caspases inflamatórias (caspase- 1 e 5) e apoptóticas (caspase-2, 3 e 9) (Martinon *et al.*, 2002) (Figura 11). Além da sua expressão em leucócitos, o *NLRP1* parece estar amplamente expresso em vários tecidos epiteliais, em neurônios e oligodendrócitos.

Em uma população chinesa, o genótipo G/G para o SNP rs878329 do *NLRP1* mostrou ser um fator de risco para o desenvolvimento para a AR (OR=2,38). Pacientes com esse genótipo mostraram maiores níveis de RNAm do que indivíduos com o genótipo C/C (Sui *et al.*, 2012). Pontillo *et al.* (2012) em uma população brasileira, associou a variante rs2670660, localizada na região promotora, e o haplótipo rs12150220-rs2670660 A-G do gene *NLRP1* ao LES e em particular com a ocorrência de nefrite, artrite e lesões cutâneas. Esses mesmos polimorfismos mostraram aumentar a produção de IL-1 β a partir de monócitos no estudo de Levandowski *et al.* (2013).

O *NLRP3*, localizado no braço longo do cromossomo 1 (1q44), é expresso em baixas quantidades nas células apresentadoras de antígenos, tais como macrófagos e células dendríticas. Um aumento na expressão do *NLRP3* mediado pela ativação do fator de transcrição NF- κ B e uma alteração na estrutura e função da proteína são críticos para a ativação desse inflamassoma (Bauernfeind *et al.*, 2009). A combinação entre os polimorfismos Q750K (rs35829419 C>A) do gene *NLRP3* e o C10X (rs2043211 A>T) no *CARD8* mostrou estar associada tanto à susceptibilidade como à severidade da AR. Essa combinação de polimorfismos mostrou causar um atraso na apoptose dos neutrófilos (Blomgran *et al.*, 2012). A mutação C10X isoladamente mostrou correlação com a atividade inflamatória da AR em pacientes suíços (Kastbom *et al.*, 2008), já a presença isolada do alelo menos frequente do polimorfismo Q750K do gene *NLRP3* mostrou-se associada com o aumento do risco de acidente vascular cerebral/ataque isquêmico transiente (OR 2,01) (Kastbom *et al.*, 2015). O polimorfismo C10X no gene *CARD8* também mostrou associação com o desenvolvimento do LES em pacientes do sexo masculino em Taiwan (Yang *et al.*, 2015).

O polimorfismo C10X introduz um códon de parada prematuro, resultando na produção de uma proteína truncada (Bagnall *et al.*, 2008). Apesar do papel da *CARD8* ainda não estar claro, propõem-se que atue como regulação negativa da ativação do *NLRP3* através da interação física com a caspase-1. Como consequência da variante C10X, a proteína *CARD8* não realiza sua função de regulação negativa de maneira correta, acarretando uma maior secreção de IL-1 β (Roberts *et al.*, 2010).

O papel dos polimorfismos nos genes das citocinas ativadas pelo inflamassoma também foi avaliado em diversos estudos. Variantes nos genes da

IL-18 e IL-1 β mostraram associação com o risco ao LES em diferentes populações (Camargo *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2013; Wen *et al.*, 2014). Sánchez *et al.*, 2009 selecionou nove SNPs no gene IL-18 e observou a associação da variante rs360719 (T>C) com a susceptibilidade ao LES. O alelo de risco C mostrou associação com um aumento significativo na expressão de RNAm da IL-18. Esse polimorfismo elimina o sitio de ligação para o fator transcricional OCT-1, o qual tem papel regulador na expressão de diversos genes, inclusive de citocinas.

Polimorfismos nos genes do inflamassoma também foram associados a outras doenças inflamatórias crônicas, tais como Psoríase (Carlström *et al.*, 2012), Doença de Crohn (Schoultz *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2010), Doença Celíaca (Pontillo *et al.*, 2011), Diabetes Tipo 1 (Magitta *et al.*, 2009; Pontillo *et al.*, 2010) e Vitiligo (Levandowski *et al.*, 2013).

Com a hipótese de que alterações na ativação do inflamassoma possam contribuir com o desenvolvimento da AR e do LES, o presente estudo abordou dois pontos: a associação de polimorfismos nos principais genes do inflamassoma com a susceptibilidade à AR e ao LES e suas manifestações clínicas, assim como a expressão gênica do inflamassoma nos monócitos de pacientes com AR e pacientes com LES.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel do inflamassoma no desenvolvimento da Artrite Reumatoide e do Lupus Eritematoso Sistêmico

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Investigar a possível associação de polimorfismos dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL1B* e *IL18* com a susceptibilidade à AR e ao LES.
- 2 Investigar a possível associação de polimorfismos dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL1B* e *IL18* com a produção de Fator Reumatoide e a presença de erosões ósseas; e com a atividade da doença e com grau de comprometimento funcional nos pacientes com AR, mensurados pelos índices clínicos DAS28 e HAQ, respectivamente.
- 3 Investigar a possível associação de polimorfismos dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL1B* e *IL18* com as principais manifestações clínicas do LES.
- 4 Avaliar a expressão dos principais genes do inflamassoma em monócitos de pacientes com AR e com LES não estimulados e estimulados *in vitro*.

4 CAPITULO I

Artigo submetido no Periódico Journal of Molecular Medicine (Fator de impacto: 4.855, Qualis A1).

Título do artigo:

Inflammassome component influence upon Rheumathoid Arthritis' development

Autores:

Catarina Addobbati Jordão Cavalcanti^{1,2}, Heidi Lacerda Alves da Cruz², José Eduardo Adelino², Amanda Luíze Melo Tavares Ramos², Thiago Sotero Fragoso³, Alexandre Domingues⁴, Laurindo Ferreira da Rocha Junior⁴, Ângela Luiza Branco Pinto Duarte⁴, Renê Donizeti Ribeiro Oliveira⁵, Paulo Louzada-Júnior⁵, Eduardo Antônio Donadi⁵, Alessandra Pontillo⁶, Jaqueline de Azevêdo Silva², Sergio Crovella^{1,2}, Paula Sandrin-Garcia^{1,2}.

Afiliação:

1. Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
2. Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
3. Serviço de Reumatologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, Brasil.
4. Divisão de Reumatologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
5. Divisão de Imunologia Clínica, Departamento de Medicina, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
6. Laboratório de Immunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil.

INFLAMMASOME COMPONENT INFLUENCE UPON RHEUMATOID ARTHRITIS' DEVELOPMENT

Authors

Catarina Addobbati Jordão Cavalcanti^{1,2}, Heidi Lacerda Alves da Cruz², José Eduardo Adelino², Amanda Luíze Melo Tavares Ramos², Thiago Sotero Fragoso³, Alexandre Domingues⁴, Laurindo Ferreira da Rocha Junior⁴, Ângela Luiza Branco Pinto Duarte⁴, Renê Donizeti Ribeiro Oliveira⁵, Paulo Louzada-Júnior⁵, Eduardo Antônio Donadi⁵, Alessandra Pontillo⁶, Jaqueline de Azevêdo Silva², Sergio Crovella^{1,2} and Paula Sandrin-Garcia^{1,2}.

Affiliation

- ^{1.} Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
- ^{2.} Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
- ^{3.} Rheumatology Service, Clinical Hospital, Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil.
- ^{4.} Rheumatology Division, Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
- ^{5.} Clinical Immunology Division, Department of Medicine, Medicine Faculty of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.
- ^{6.} Laboratory of Immunogenetics, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil.

Corresponding author:

Paula Sandrin-Garcia

Department of Genetics, Federal University of Pernambuco.

Av. Moraes Rego, 1235, Recife/ Brazil CEP 50760-901, Telephone / Fax 55 8121268522.

Email: paulasandrin27@gmail.com

SHORT RUNNING FOOTLINE: RA AND INFLAMMASOME

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory and autoimmune disease characterized by joint commitment with exacerbated IL-1 β production. The genetic component has pivotal role in RA etiology with several genes contributing to immune balance breakdown. IL-1 β secretion is induced by the activation of inflammasomes, which are multiprotein complexes capable of promoting processing and maturation of IL-1 β . Polymorphisms and differential expression of inflammasome have been associated with inflammatory diseases, such as Systemic Lupus Erythematosus and hereditary periodic fever, as well as RA. In the present study, we analyzed 13 single nucleotide polymorphisms within 6 inflammasome genes (*NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*) as well as *IL1B* and *IL18* genes in two different Brazilian populations (from Northeast and Southeast Brazil). We also evaluated inflammasome genes expression profile in resting and LPS+ATP-treated monocytes from RA patients and healthy individuals. For genetic association study, 218 patients and 307 healthy controls were genotyped. For gene expression study, inflammasome genes mRNA levels of 12 patients and 10 healthy individuals were assessed by qPCR. Our results showed that rs10754558 *NLRP3* and rs2043211 *CARD8* polymorphisms are associated with RA development (p-value=0.044, OR=1.772, statistical power=0.999) and severity measured by HAQ (Health assessment questionnaire) (p-value=0.03), respectively. Gene expression analyses showed that RA patients display a chronic activation of *CASP1*, *IL1B* and *IL1R* genes independently of LPS+ATP activation. In LPS+ATP-treated monocytes, *NLRP3* and *NLRC4* expression was also significantly higher in patients compared with controls. Our results, the first reported in Brazilian populations, support the role of inflammasome in the development of RA.

Key words: Inflammasome, Rheumatoid Arthritis, SNPs, Autoimmunity and Monocytes.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a complex and chronic inflammatory disease associated with progressive joint destruction, disabling and systemic complications. It is characterized by proliferation of synovial tissue, autoantibody production and systemic alterations such as cardiovascular, pulmonary and dermatological [1,2]. RA is a disorder with an important sex bias, substantially more affecting women from 30-50 years old [2,3]. Even though RA etiology remains unclear, it depends upon the interaction between genetic and environmental factors. The genetic component has a pivotal role in RA etiology with several genes contributing in disease's triggering [2,4]. The majority of genetic variations associated with RA development are within immune response-related genes, with the Human Leukocyte Antigen (HLA) variants being the most well-known genetic risk factors [4].

The pathogenesis of RA encompasses abnormal innate and adaptive immune responses, being Tumor Necrosis Factor and interleukin (IL)-6 the main proinflammatory cytokines involved in RA pathogenesis [5,6]. High levels of IL-1 β , secreted by monocytes, macrophages and dendritic cells, have also been involved in RA, revealing an important role in bone resorption and cartilage destruction [7]. Indeed, the therapeutic inhibition of IL-1 reduces signs and symptoms of RA as well as radiological damage. Animal models of RA, such as collagen-induced arthritis and antigen-induced arthritis, also respond to IL-1 inhibition [8,9], underlining the importance of this cytokine in disease's development.

IL-1 β secretion is induced by the activation of inflammasomes, which are multiprotein complexes capable of promoting the processing and maturation of IL-1 β . Assembly of inflammasomes depends upon the activation of intracellular receptors belonging to Nod Like Receptors and PHIN Receptors families, such as NLRP1, NLRP3,

NLRC4 and AIM2, the adaptor molecule ASC and the effector protein caspase-1. When sensing pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) or danger-associated molecular pattern (DAMPs), the intracellular receptors recruit the adaptor protein ASC, which triggers the cleavage of procaspase-1 into caspase-1. Activated caspase-1 processes pro-IL-1 β and pro-IL-18 cytokines into their mature and secreted form. Inflammasome activation is strictly regulated by transcriptional mechanisms (i.e.: NF-kB dependent transcription of *NLRP3*, *AIM2*, *IL1B*), post-transductional modifications (i.e.: ubiquitination, nitrosilation), as well as by endogenous proteins, such as CARD8, which specifically inhibit NLRP3-inflammasome activation. Pro-IL-1 β production is dependent on NF-kB role, being the cytokine secretion a two-stage process [10-12].

Mutations in inflammasome genes may cause rare autoinflammatory disorders characterized by constitutively elevated level of IL-1 β contributing to the systemic inflammatory presentation [13]. Polymorphisms in inflammasome genes have been associated to more common chronic inflammatory disorders, such as Systemic Lupus Erythematosus [14], Psoriasis [15], Crohn's disease [16,17], Celiac disease [18,19], Type 1 Diabetes [18,20] and Vitiligo [21]. Previous studies reported the association between *NLRP3* and/or *CARD8* and RA in different populations [22-27], and despite their heterogeneity, the results pointed out a major role of NLRP3-inflammasome dysregulation in RA pathogenesis.

Herein, we first performed in Brazilian populations a genetic association study to assess inflammasome and also *IL1B* and *IL18* gene polymorphisms and the susceptibility to RA and its clinical manifestations. Moreover we analyzed inflammasome components genes as well as *IL1B* and *IL1R* expression profile in peripheral blood derived monocytes from RA subjects with and without inflammasome activation *in vitro*.

MATERIAL AND METHODS

Genotyping study

Subjects

For this study, a total of 218 RA patients and 307 healthy individuals, all from Brazil, were enrolled. The Northeastern sample comprised 128 patients (mean age 51.3 ± 11.7 years; mean age at diagnosis 42.1 ± 11.7 years; 122 females and 6 males) and 149 healthy individuals (mean age 39.2 ± 14.2 years; 122 females and 27 males) from the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. The Southeast sample comprised 90 patients (mean age 55.7 ± 10.8 years; mean age at diagnosis 44.8 ± 13.2 years; 83 females and 7 males) and 158 healthy controls (mean age 37.4 ± 11.3 years; 76 females and 82 males) from state of São Paulo, Southeast Brazil. Patients from Northeastern Brazil were under care of the Division of Rheumatology of Hospital das Clínicas from Federal University of Pernambuco, whereas patients from Southeast Brazil were recruited from Division of Clinical Immunology of University Hospital of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. All RA patients were diagnosed according to the American College of Rheumatology (ACR) criteria [28]; control individuals were healthy blood donors without previous family history of autoimmune diseases, as reported in appropriate questionnaire. The patients were evaluated for the presence of Rheumatoid Factor and bone erosions. DAS28 (Disease activity score in 28 joints) [29] and HAQ (Health assessment questionnaire) [30,31] were applied to patients as a measurement of disease activity and functional disability, respectively.

Aiming to maintain a good statistical power, and also to report the results as from the Brazilian population as a whole, we joined the two groups into one, and then correct the analysis by geographical origin and demographic data. The Demographic and clinical features from all assessed RA patients and controls are shown in Supplementary data 1.

All procedures involving human participants were in accordance with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. All the participants provided a written informed consent approved by the local Research Ethics Committee (Southeast: HCRP 2981/2009 and Northeast: CAAE 03065312.3.0000.5208).

DNA isolation

Genomic DNA was isolated from whole blood samples, using DNA Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) according manufacturer's protocol or using a salting out method [32].

SNPs selection and genotyping

Thirteen SNPs within *IL1B*, *IL18*, *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8* and *CASP1* genes were selected according to previously reported association studies [18,19] and/or their functional effect on protein activity [16,33] or mRNA stability [34]. More details about all assessed SNPs are reported in Supplementary data 2.

SNPs genotyping was performed using fluorogenic allele specific probes (Taqman Probes, Applied Biosystems, USA) on an ABI7500 sequence detection system (Applied Biosystems, USA).

Statistical analysis

Genotype distribution was compared for Hardy–Weinberg (HW) equilibrium using Genotype Transposer [35]. At a first sight, considering RA patients and controls independently of their geographical origin, the allele and genotype frequencies of controls and RA patients were compared using chi-square test. Binary logistic regression was used to confirm the association between the polymorphisms and RA, adjusting for origin of sample and gender. Bonferroni's correction for multiple comparisons was applied ($p_{\text{Bonf}} = \text{observed } p\text{-value} \times N$, $N = \text{number of studied polymorphisms within the same gene}$). The possible association of the assessed polymorphisms with DAS28 and HAQ in RA patients

was analyzed using the Likelihood ratio test. The significance level was set at $\alpha=0.05$ (two tailed). All statistical analyses were performed with SPSS 16.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). The eventual presence of linkage disequilibrium (LD) between polymorphisms within the same gene and the association of haplotypes with RA susceptibility were evaluated by using the online software SNPStats [36]. The power was verified using G*Power software 3.1.9.2 [37].

Inflammasome genes expression profile in peripheral blood monocytes

Heparinized whole blood samples were obtained from twelve post-menopausal RA female patients (mean age 50.42 ± 13.91 years) and ten healthy post-menopausal female controls (HC) (mean age 57.5 ± 8.14 years) from metropolitan area of state of Pernambuco. None of patients nor controls had received systemic treatment recently, as corticosteroids drugs. To evaluate the correlation of inflammasome mRNA levels and RA activity, measured by DAS28, patients were stratified as high disease activity ($\text{DAS28} > 5.1$), moderate disease activity ($3.2 < \text{DAS28} < 5.1$), low disease activity ($2.6 < \text{DAS28} < 3.2$) or disease in remission ($\text{DAS28} < 2.6$) [30,31].

Peripheral blood monocytes were isolated by adherence from PBMCs obtained by centrifugation over Ficoll-Paque (Sigma-Aldrich, USA) gradient. An amount of 5×10^6 PBMCs/well was cultured in RPMI 1640 containing 10% fetal bovine serum in 24-wells microplate (Invitrogen, Life Technology, USA). For this assay, we performed biological replicates. Monocytes were stimulated with 1 $\mu\text{g/ml}$ lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich) for 4 hours and 1mM adenosine triphosphate (ATP; Sigma-Aldrich) for 15'. After incubation supernatants were collected for cytokines measurement and cells were lysed for mRNA isolation and gene expression analysis. Monocytes RNA isolation was performed using the RNAqueous micro kit (Ambion, Life Technologies, USA), following the manufacturer's instructions. The RNA samples were stored at -80°C until used and RNA

integrity analysis was performed by gel electrophoresis and quantification by Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA). cDNA synthesis was performed with SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Invitrogen, Life Technology, USA).

The major inflammasome genes, *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *ASC/PYCARD* and *CASP1*, and *IL1B* and *IL1R* genes were amplified with specific TaqMan Gene Expression Assays using the ABI 7500 SDS platform (Applied Biosystems, USA). *GAPDH* was the reference gene used for normalization. Relative quantitative expression was calculated comparing RA and healthy individuals cells (Fold change (FC) = $RA \cdot 2^{-\Delta Cq} / HC \cdot 2^{-\Delta Cq}$) following the indications by Schmittgen and Livak, 2008 [38]. Student's t-Test was applied to compare different groups.

IL-1 β measurement

The IL-1 β secreted by monocytes was measured with ELISA kit (R&D systems, USA) following manufacturer's protocols and results were expressed in picograms per milliliter. One-way ANOVA test with Bonferroni post-test was applied to compare IL-1 β secretion in RA and healthy controls cells as well as stimulated and resting cells.

RESULTS

Genetic association study

Genotype distributions were in Hardy–Weinberg equilibrium for the assessed SNPs with exception of *NLRP3* rs35829419 and *IL1B* rs1143643 SNPs in the controls (p-value=0.0001 and 0.0419, respectively). No association was observed among polymorphisms within *NLRP1*, *NLRC4*, *AIM2*, *CASP1*, *IL1B* and *IL18* genes and RA in studied population. Genotype and allele frequencies are shown in Table 1.

Considering RA patients and controls independently of their geographical origin, it showed a significant association between the *NLRP3* rs10754558 SNP [C>G] and RA

susceptibility with a statistical power=0.999. The C allele and C/C genotype were significantly more frequent in patients than in controls (67% vs 56%, p-value=0.005, OR=1.59, 95%CI=1.23-2.05; and 47% vs 32%, p-value=0.0036, OR=2.23, 95%CI=1.32-3.75, respectively). After applying Bonferroni's correction, the association remained statistically significant (pBonf=0.01 and 0.007, respectively).

When we performed a binary logistic regression adjusting for gender and geographical origin of sample, the association of C/C genotype for *NLRP3* rs10754558 SNP with susceptibility to RA remained statistically significant (p-value=0.044, OR=1.77, 95%CI=1.23–3.09) (Table 1), suggesting that the association is not affected by gender or origin.

The association of the studied SNPs with Rheumatoid Factor production and bone erosions development was also evaluated and no significant association was observed (data not shown).

When we assessed the influence of the studied polymorphisms on disease activity (DAS28) and patient's functional disability (HAQ), the association between *CARD8* rs2043211 SNP [A>T] and a higher mean for HAQ was observed. Patients homozygous for T allele presented a higher functional disability (HAQ mean=2.13 ± 0.20) when compared to homozygous for A allele (HAQ mean=1.32 ± 0.11) and heterozygous patients (HAQ mean=1.41± 0.10). This association was observed in both codominant (p-value = 0.03, *Akaike Information Criterion* (AIC) = 309.2) and recessive model (p-value = 0.01, AIC = 307.5) (Table 2).

Linkage disequilibrium was found for polymorphisms rs12150220 [A>T] and rs2670660 [A>G] within *NLRP1* (D'=87), rs455060 [A>G] and rs212713 [T>C] within *NLRC4* (D'=0.94) and also for polymorphisms rs1143643 [C>T] and rs1143634 [G>A] in

IL1B gene ($D'=0.82$). However, the observed haplotypes were not differentially distributed between RA patients and healthy individuals (Data not shown).

Inflammasome expression analyses

We evaluated the expression of major inflammasome genes (*NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *ASC* and *CASP1*) and of IL-1 β cytokine and its receptor genes (*IL1B* and *IL1R*) in non-stimulated/resting and LPS+ATP-stimulated monocytes from twelve RA patients and ten healthy controls. First, basal as well as LPS+ATP-stimulated expression was evaluated comparing RA patients with controls. We found a statistical significant increase in the basal expression of *CASP1* (+499.02-fold, p -value=0.01), *IL1B* (+2.976-fold, p -value=0.003) and *IL1R* (+216.6-fold, p -value=0.013) genes in untreated monocytes from RA patients when compared with untreated monocytes from healthy individuals (Figure 1A). In LPS+ATP-treated monocytes, *NLRP3* (+14.5-fold, p -value=0.002), *NLRC4* (+53.88-fold, p -value=0.04), *CASP1* (+19.1-fold, p -value=0.004), *IL1B* (+19.7-fold, p -value=0.004) and *IL1R* (+14.1-fold, p -value=0.007) genes were statistical significantly upregulated in monocytes from RA patients compared to monocytes from control individuals (Figure 1B).

LPS+ATP induced IL-1 β secretion in monocytes from RA (LPS+ATP versus ATP: $p=0.007$; LPS+ATP versus Resting: $p=0.006$) as well as from healthy individuals (LPS+ATP versus ATP: $p=0.002$; LPS+ATP versus Resting, $p=0.006$). The stimulation with LPS induced a small increase in IL-1 β secretion in controls, however a greater augmentation was observed in LPS+ATP cells. In RA cells, LPS as well LPS+ATP were able to induce a similar increment in IL-1 β secretion.

IL-1 β secretion was incremented in RA patients compared to controls in resting (mean=6.12 $\pm$ 10.8 vs. 2.13 $\pm$ 2.98pg/ml), +ATP (12.6 $\pm$ 19.1 vs. 2.65 $\pm$ 3.26pg/ml), +LPS (124.2 $\pm$ 129.7 vs. 16.12 $\pm$ 8.8pg/ml) and in LPS+ATP cells (287.75 $\pm$ 175.63 vs.

273.7±174pg/ml, respectively). However, no statistical significance was observed between RA and healthy individuals (Figure 2).

When we evaluated the correlation of inflammasome components and *IL1B* and *IL18* mRNA levels with RA activity, measured by DAS28, no statistical significance was observed (Data not show).

DISCUSSION

In the last years, substantial information has emerged connecting deregulated inflammasome signaling to inflammatory diseases. In this study we evidenced for the first time the association between SNPs in inflammasome genes and RA development in the Brazilian population. In addition, we demonstrated a dysregulated expression of some inflammasome components as well as IL-1 β cytokine and its receptor genes (*IL1B* and *IL1R*) in RA patients.

The *NLRP3* rs10754558 [C>G] C allele seems to confer an augmented risk for the development of RA when in homozygosis (OR=1.77) with a power up to 99.9%; the moderate value of OR suggest that being RA a multifactorial trait *NLRP3* SNP gives a partial contribution to diseases susceptibility. This SNP is located within the 3'UTR of *NLRP3* gene and according to the PolymiRTS Database 2.0 (<http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/>) its occurrence affects the binding of miRNAs. In presence of G allele, there is a binding site for miR-3529-3p and miR-549a, while the C allele abrogates such site, but gives rise to a binding site for miR-146a-5p, miR-146b-5p, miR-589-5p and miR-7153-5p. If and how rs10754558 SNP interferes with the binding of these miRNAs *in vivo* remains to be further elucidated. According to Hitomi *et al.*, 2009, functional analyses of *NLRP3* rs10754558 SNP showed that allele G influences higher *NLRP3* expression (1.4-fold) by altering mRNA stability [34]. The eventual effect of this

1.4-fold increasing in *NLRP3* expression on the inflammasome activation has not been investigated. The C allele was also associated to Type 1 Diabetes Mellitus susceptibility [18] and to Systemic Lupus Erythematosus development (personal communication, manuscript submitted), suggesting a role of this polymorphism in autoimmunity development.

When considering inflammasome SNPs in RA clinical manifestations we observed the association between *CARD8* rs2043211 SNP [A>T] (p.C10X) and disease's severity. Patients homozygous for T allele presented a higher functional disability measured by HAQ. *CARD8* interacts physically with caspase-1 and negatively regulates caspase-1-dependent IL-1 β expression and nuclear factor NF κ B activation [39-42]. The rs2043211 polymorphism introduces a premature stop codon (Cys>Stop), which results in the expression of a severely truncated protein [43]. The exact role of *CARD8* in inflammasome biology is still unclear. It has been proposed that *CARD8* acts as a modulator of *NLRP3* activation or it exerts an inflammasome independent role, as NF- κ B inducer [44]. *CARD8* C10X variation leads to an increased secretion of IL-1 β , especially in combination with *NLRP3* Q705K [16]. Moreover this variation was associated to an increased induction of NF κ B activity and its translocation to the nucleus [45], which leads to high constitutive levels of pro-IL-1 β and tumor necrosis factor α , mediators of inflammation in RA [46]. Furthermore, NF- κ B has been reported to contribute to the proliferation of synovial cells and, consequently, to bone and cartilage destruction [47,48].

Kastbom *et al.*, 2010 [27] and Fontalba *et al.*, 2007 [45] also described an association between *CARD8* p.C10X polymorphism and RA severity in Swedish and Spanish patients, respectively. Differently from our study, both studies assessed RA severity through cumulative amount DAS28 over 2 years, while we have chosen to measure the severity of the disease by the HAQ due to the fluctuation of the DAS28 during

the course of the disease. However, our study corroborates the involvement of *CARD8* p.C10X polymorphism in RA severity and then its possible use as a genetic prognostic marker for RA.

The combination between the minor alleles for *NLRP3* rs35829419 (Q705K) and *CARD8* rs2043211 (p.C10X) polymorphisms was described as associated with delayed apoptosis of neutrophils [49] and RA susceptibility and severity [22]. However, it was not possible to confirm this association in our population, as the *NLRP3* A/A genotype was not found in our patients group. When we tested the combination between the other genotypes for those polymorphisms, no significant association was observed.

Moreover, our results corroborate the findings from García-Bermúdez *et al.*, 2013 [26], Hamad *et al.*, 2011 [24] and Kastbom *et al.*, 2010 [27], which demonstrated the lack of association of *CARD8* rs2043211 with RA susceptibility when individually analyzed in Spanish, French, Tunisian and Swedish populations. Despite the association between the rs2043211 SNP and RA severity, this SNP was not associated to bone erosions and rheumatoid factor in our population.

When we assessed the gene expression profile for RA patients, we found a statistical significant upregulation of *CASP1*, *IL1B* and *IL1R* genes in untreated monocytes from RA patients when compared with healthy individuals. This result suggests that RA patients are characterized by a chronic expression of *CASP1*, *IL1B* and *IL1R* genes. In LPS+ATP-treated monocytes from RA patients, the same genes were upregulated but accompanied by *NLRP3* and *NLRC4* genes. This increased expression of *CASP1*, *IL1B* and *IL1R* in stimulated monocytes from patients may be consequence of the previous upregulation in resting monocytes. The observed augmented expression of *NLRP3* and *NLRC4* genes in patients after stimulus prompt us to hypothesize that *NLRP3* and *NLRC4* transcription are dysregulated in RA patients, contributing to the establishment of the

exacerbated inflammation observed in the disease. When we compared the genes expression between patients with disease in remission and patients with high disease activity, no statistical difference was observed, suggesting that the treatment of patients is efficient to control the disease symptoms but may be not able to control the deregulation of inflammasome.

Being aware that other mechanisms may influence upon IL-1 β production overall, the observed differences in inflammasome components and IL-1 β and its receptor genes expression between patients and healthy controls are accompanied by IL-1 β secretion *ex vivo* monocytes. In all studied conditions, the RA monocytes secreted higher amounts of IL-1 β . Basal secretion of IL-1 β in RA monocytes was higher compared to healthy ones, indicating a constitutive secretion of pro-inflammatory cytokine.

The exact mechanisms responsible for the production and secretion of IL-1 β remain unclear, but two signals are traditionally required. The first signal, in our case LPS, induces the transcription of pro-IL-1 β and inflammasome subunits; the second signal promotes rapid activation of caspase-1 and then secretion of mature IL-1 β [50,51]. This second signal is provided by reduction of intracellular K⁺ generated by ATP stimulus. Of note in both LPS-stimulated and ATP-stimulated RA monocyte, the signals individually are sufficient to induce an augment of IL-1 β secretion, without the common first or second signal mediation (Figure 3), suggesting an inflammasome complex more prone to activation in RA monocytes than in healthy ones.

Mathews *et al.*, 2014 [23] also showed a higher *NLRP3* and *CASP1* expression in RA patients. However, in this study, the gene expression was characterized directly in peripheral blood mononuclear cells of patients. Thereby, the upregulation of these inflammasome components could be due to the abundant release of DAMPs upon tissue damage, typical in RA pathogenesis [52-54]. Differently, our study evaluated the

inflammasome genes expression in RA and control individual's monocytes under the same conditions, proving indeed the dysregulated transcription of these inflammasome components.

The importance of *NLRP3* in RA pathogenesis is confirmed by the findings of increased *NLRP3* mRNA in the synovium of RA patients compared to individuals suffering from non-autoimmune osteoarthritis [25]. The NLRP3-inflammasome was described as activator of both apoptic and pyroptotic cell death [55]. Therefore, besides the excessive IL-1 β secretion, the deregulated activation of this complex may exacerbate the cell death, contributing to the inflammatory process and its maintenance in RA disease.

In conclusion, herein, we provide enough data to infer that *CASP1*, *IL1B* and *IL1R* are chronically activated in RA patients as well as *NLRP3* and *NLRC4* genes are dysregulated transcript upon stimulus. We also demonstrated that *NLRP3* and *CARD8* polymorphisms are associated to RA susceptibility and severity in our studied populations. These results are useful to help understanding the role of inflamassome complex in RA.

KEY MESSAGES

- *NLRP3* polymorphism is associated to RA susceptibility
- *CARD8* polymorphism is associated to RA severity and may be used as a genetic prognostic marker for RA.
- *CASP1*, *IL1B* and *IL1R* genes are chronically activated in RA patients as well as *NLRP3* and *NLRC4* genes are dysregulated transcript upon stimulus.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the following Brazilian funding agencies: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FAPESP (Fundação Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco).

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflicts of interest

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

CAJC conducted experiments, wrote the manuscript and prepared the tables and figures; HLAC, JEA and ALMTR helped conducting the experiments and provided insightful suggestions to the manuscript; PSG, JAS, AP and SC assisted in the study design and coordination and read, corrected and provided major suggestions to this manuscript; TSF, AD, LFRJ, ALBPD, RDRO, PLJ and EAD recruited patients and participated in data acquisition. All authors addressed important intellectual content and approved the final manuscript for publication.

REFERENCES

1. Hitchon CA, El-Gabalawy HS (2011) The synovium in rheumatoid arthritis. *Open Rheumatol J.* 5: 107-114.
2. Tobón GJ, Youinou P, Saraux A (2010) The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 9(5):A288-92.
3. Alamanos Y, Drosos AA (2005) Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 4(3):130-6.
4. Jacob N, Jacob CO (2012) Genetics of rheumatoid arthritis: an impressionist perspective. *Rheum Dis Clin North Am.* 38(2):243-57.
5. Firestein GS (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423:356–61.
6. Gierut A, Perlman H, Pope RM (2010) Innate immunity and rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 36(2): 271-96.
7. Joosten LA, Helsen MM, Saxne T, van De Loo FA, Heinegard D, van Den Berg WB (1999) IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J Immunol.* 163:5049–55.
8. Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P, *et al* (1998) Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum.* 41:2196–204.
9. Alten R, Gram H, Joosten LA, van den Berg WB, Sieper J, Wassenberg S, *et al* (2008) The human anti-IL-1 beta monoclonal antibody ACZ885 is effective in joint inflammation models in mice and in a proof-of-concept study in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 10:R67.
10. Shaw PJ, McDermott MF, Kanneganti TD (2011) Inflammasomes and autoimmunity. *Trends Mol Med.* 17(2):57–64.
11. Man SM, Kanneganti TD (2015) Regulation of inflammasome activation. *Immunol Rev.* 265(1):6-21.
12. Ito S, Hara Y, Kubota T (2014) CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Res Ther.* 12;16(1):R52.
13. Neven B, Prieur AM, Quartier dit Maire P (2008) Cryopyrinopathies: update on pathogenesis and treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 4: 481–489.
14. Pontillo A, Girardelli M, Kamada AJ, Pancotto JA, Donadi EA, Crovella S, *et al* (2012) Polimorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 45(4):271-8.
15. Carlström M, Ekman AK, Petersson S, Söderkvist P, Enerbäck C (2012) Genetic support for the role of the NLRP3 inflammasome in psoriasis susceptibility. *Exp Dermatol.* 21(12):932-7.
16. Roberts RL, Topless RK, Phipps-Green AJ, Gearry RB, Barclay ML, Merriman TR (2010) Evidence of interaction of CARD8 rs2043211 with NALP3 rs35829419 in Crohn's disease. *Genes Immun.* 11(4):351-6.

17. Schoultz I, Verma D, Halfvarsson J, Törkvist L, Fredrikson M, Sjöqvist U, *et al* (2009) Combined polymorphisms in genes encoding the inflammasome components NALP3 and CARD8 confer susceptibility to Crohn's disease in Swedish men. *Am J Gastroenterol.* 104(5):1180-8.
18. Pontillo A, Brandao L, Guimaraes R, Segat L, Araujo J, Crovella S (2010) Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil. *Autoimmunity* 43(8):583-9.
19. Pontillo A, Vendramin A, Catamo E, Fabris A, Crovella S (2011) The missense variation Q705K in CIAS1/NALP3/NLRP3 gene and an NLRP1 haplotype are associated with celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 106(3):539-44.
20. Magitta NF, Bøe Wolff AS, Johansson S, Skinningsrud B, Lie BA, Myhr KM, *et al* (2009) A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. *Genes Immun.* 10:120–124.
21. Levandowski CB, Mailloux CM, Ferrara TM, Gowan K, Ben S, Jin Y, *et al* (2013) NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1 β processing via the NLRP1 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(8):2952-6
22. Kastbom A, Verma D, Eriksson P, Skogh T, Wingren G, Söderkvist P (2008) Genetic variation in proteins of the cryopyrin inflammasome influences susceptibility and severity of rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Rheumatology (Oxford)* 47(4):415-7.
23. Mathews RJ, Robinson JI, Battellino M, Wong C, Taylor JC; Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate (BRAGGSS), *et al* (2014) Evidence of NLRP3-inflammasome activation in rheumatoid arthritis (RA); genetic variants within the NLRP3-inflammasome complex in relation to susceptibility to RA and response to anti-TNF treatment. *Ann Rheum Dis.* 73(6):1202-10.
24. Ben Hamad M, Cornelis F, Marzouk S, Chabchoub G, Bahloul Z, Rebai A, *et al* (2012) Association study of CARD8 (p.C10X) and NLRP3 (p.Q705K) variants with rheumatoid arthritis in French and Tunisian populations. *Int J Immunogenet.* 39(2):131-6.
25. Rosengren S, Hoffman HM, Bugbee W, Boyle DL (2005) Expression and regulation of cryopyrin and related proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Ann Rheum Dis.* 64(5):708-14
26. García-Bermúdez M, López-Mejías R, González-Juanatey C, Corrales A, Castañeda S, Ortiz AM, *et al* (2013) CARD8 rs2043211 (p.C10X) polymorphism is not associated with disease susceptibility or cardiovascular events in Spanish rheumatoid arthritis patients. *DNA Cell Biol.* 32(1):28-33.
27. Kastbom A, Johansson M, Verma D, Söderkvist P, Rantapää-Dahlqvist S (2010) CARD8 p.C10X polymorphism is associated with inflammatory activity in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 69(4):723-6.
28. Kay J, Upchurch KS (2012) ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology (Oxford)* 51Suppl 6:vi5-9.

29. Ramey DR, Fries JF, Singh G (1996) The Health Assessment Questionnaire. 1995 Status and Review. In B. Spilker Quality of Life and Pharmacoeconomics in Clinical Trials, 2nd ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers.
30. Prevoo ML, van't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL (1995) Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 38:44–8.
31. Van Gestel AM, Haagsma CJ, van Riel PL (1998) Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joint counts. *Arthritis Rheum.* 41:1845–50.
32. Lahiri DK, Nurnberger JI (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19: 5444.
33. Roberts RL, Topless RK, Phipps-Green AJ, Gearry RB, Barclay ML, Merriman TR (2010) Evidence of interaction of CARD8 rs2043211 with NALP3 rs35829419 in Crohn's disease. *Genes Immun.* 11(4):351-6.
34. Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, *et al* (2009) Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 124(4):779-85e6.
35. Cox DG, Canzian F (2001) Genotype transposer: automated genotype manipulation for linkage disequilibrium analysis. *Bioinformatics.* 17(8):738-9.
36. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 22(15):1928-9.
37. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang, AG (2009) Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behavior Research Methods.* 41:1149-1160.
38. Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 3(6):1101-8.
39. Razmara M, Srinivasula SM, Wang L, Poyet JL, Geddes BJ, DiStefano PS (2002) CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. *J Biol Chem.* 277:13952–8.
40. Bouchier-Hayes L, Conroy H, Egan H, Adrain C, Creagh EM, MacFarlane M, *et al* (2001) CARDINAL, a novel caspase recruitment domain protein, is an inhibitor of multiple NF- κ B activation pathways. *J Biol Chem.* 276: 44069–44077.
41. Stilo R, Leonardi A, Formisano L, Di Jeso B, Vito P, Liguoro, D (2002) TUCAN/CARDINAL and DRAL participate in a common pathway for modulation of NF- κ B activation. *FEBS Lett.* 521:165–169.
42. von Kampen O, Lipinski S, Till A, Martin SJ, Nietfeld W, Lehrach H, *et al* (2010) Caspase recruitment domain-containing protein 8 (CARD8) negatively regulates NOD2-mediated signaling. *J Biol Chem.* 285: 19921–19926.
43. Bagnall RD, Roberts RG, Mirza MM, Torigoe T, Prescott NJ, Mathew CG (2008) Novel isoforms of the CARD8 (TUCAN) gene evade a nonsense mutation. *Eur J Hum Genet.* 16:619–25.

44. Paramel GV, Sirsjö A, Fransén K (2015) Role of genetic alterations in the NLRP3 and CARD8 genes in health and disease. *Mediators Inflamm.* 2015:846782.
45. Fontalba A, Martinez-Taboada V, Gutierrez O, Pipaon C, Benito N, Balsa A, *et al* (2007) Deficiency of the NF-kappaB inhibitor caspase activating and recruitment domain 8 in patients with rheumatoid arthritis is associated with disease severity. *J Immunol.* 179:4867–73.
46. Moelants EA, Mortier A, Van Damme J, Proost P (2013) Regulation of TNF- α with a focus on rheumatoid arthritis. *Immunol Cell Biol.* 91(6):393-401.
47. Makarov SS (2001). NF- κ B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis Res.* 3:200–6.
48. Okamoto H, Cujec TP, Yamanaka H, Kamatani N (2008) Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of transcription factors. *FEBS J.* 275(18):4463-70.
49. Blomgran R, Patcha Brodin V, Verma D, Bergström I, Söderkvist P, Sjöwall C, *et al* (2012) Common genetic variations in the NALP3 inflammasome are associated with delayed apoptosis of human neutrophils. *PLoS One.* 7(3):e31326.
50. Perregaux DG, Gabel CA (1998) Human monocyte stimulus-coupled IL-1 β posttranslational processing: modulation via monovalent cations. *Am J Physiol.* 275: C1538–1547.
51. Perregaux D, Gabel CA (1994) Interleukin-1 β maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem.* 269:15195–15203.
52. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, *et al* (2012) Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* 36(3):401-14.
53. Pugin J (2012) How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. *Ann Intensive Care.* 2(1):27.
54. Davis BK, Wen H, Ting JP (2011) The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol.* 29:707-35.
55. Sagulenko V, Thygesen SJ, Sester DP, Idris A, Cridland JA, Vajjhala PR, *et al* (2013) AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC. *Cell Death Differ.* 20(9):1149-60.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *NLRP3*, *NLRP1*, *AIM2*, *CASP1*, *NLRC4*, *IL1B*, *IL1R* and *PYCARD* genes expression in RA patients compared with healthy controls (HC). The results were normalized to *GAPDH* expression. Target genes expression in healthy controls was normalized to 1 (*not reported in the graph*) and Fold Change (FC) is reported as $RA\ 2^{-\Delta\Delta CT} / HC\ 2^{-\Delta\Delta CT}$. A. Expression in non-stimulated monocytes. B. Expression in LPS+ATP-stimulated monocytes. * p-value < 0.05.

Figure 2. IL-1 β secretion in healthy controls (HC) and RA patients in non-stimulated monocytes (R); ATP-stimulated monocytes (ATP); LPS-stimulated monocytes (LPS); and LPS+ATP-stimulated monocytes (LPS+ATP). *p < 0.05.

TABLE LEGENDS

Table 1. Allele and genotype frequencies from RA patients and controls.

Table 2. Association between *CARD8* rs2043211 SNP and a higher functional disability.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data 1. Clinical features from RA patients and healthy controls.

Supplementary data 2. Polymorphisms genotyped in the inflamassome genes.

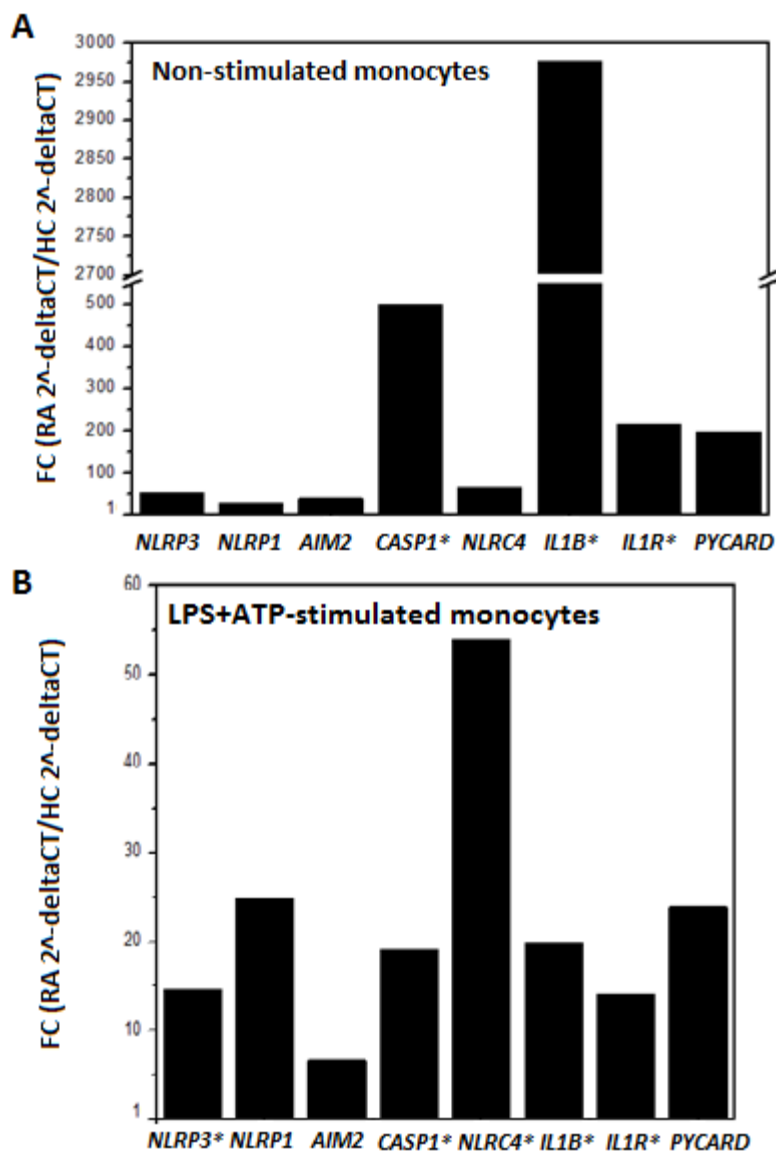


Figure 1. *NLRP3*, *NLRP1*, *AIM2*, *CASP1*, *NLRC4*, *IL1B*, *IL1R* and *PYCARD* genes expression in RA patients compared with healthy controls (HC). The results were normalized to *GAPDH* expression. Target genes expression in healthy controls was normalized to 1 (not reported in the graph) and Fold Change (FC) is reported as RA 2^{-ΔΔCT}/ HC 2^{-ΔΔCT}. A. Expression in non-stimulated monocytes. B. Expression in LPS+ATP-stimulated monocytes. * p-value < 0.05.

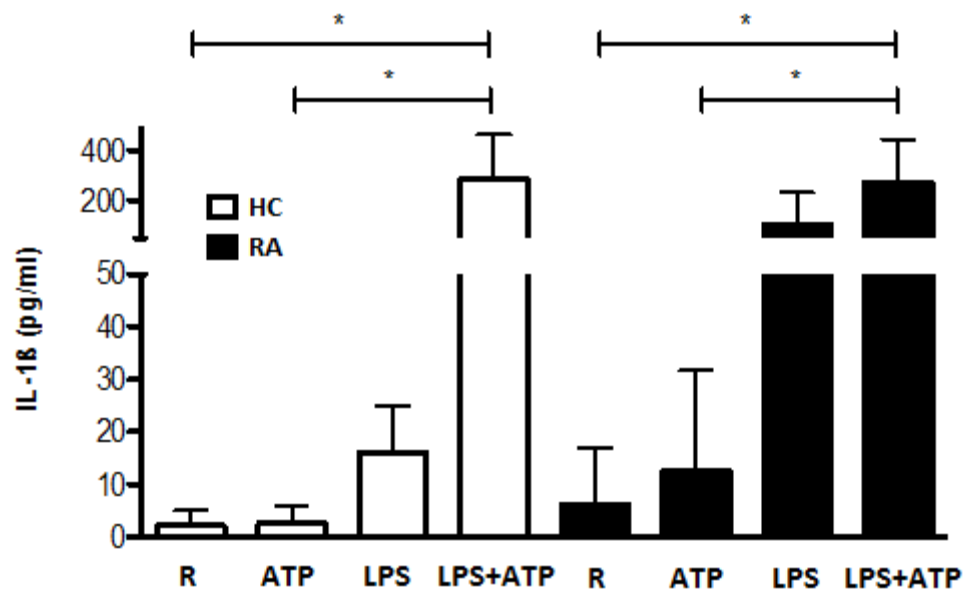


Figure 2. IL-1 β secretion in healthy controls (HC) and RA patients in non-stimulated monocytes (R); ATP-stimulated monocytes (ATP); LPS-stimulated monocytes (LPS); and LPS+ATP-stimulated monocytes (LPS+ATP). * $p < 0.05$.

Table 1. Allele and genotype frequencies from RA patients and controls.

SNPs	Controls n (%)	RA n (%)	<i>p</i>	OR	95%CI	SNPs	Controls n (%)	RA n (%)	<i>p</i>	OR	95%CI
<i>NLRP1</i> rs12150220						<i>CASP1</i> rs572687					
A	383 (66)	288 (67)		1		G	493 (82)	359 (82)		1	
T	201 (34)	144 (33)	0.77	0.95	0.73–1.24	A	109 (18)	77 (18)	0.92	0.97	0.7-1.34
AA	132 (45)	96 (44)		1		GG	200 (66)	148 (68)		1	
AT	119 (41)	96 (44)	0.66	1.11	0.75-1.64	GA	93 (31)	63 (29)	0.72	0.92	0.61-1.37
TT	41 (14)	24 (12)	0.54	0.8	0.46-1.42	AA	8 (3)	7 (3)	0.96	1.18	0.42-3.33
<i>NLRP1</i> rs2670660						<i>IL1B</i> rs1143643					
A	346 (58)	231 (55)		1		C	390 (65)	307 (71)		1	
G	248 (42)	187 (45)	0.38	1.13	0.88-1.45	T	214 (35)	127 (29)	0.05	0.75	0.57-0.99
AA	97 (33)	62 (30)		1		CC	134 (44)	111 (51)			
AG	152 (51)	107 (51)	0.71	1.1	0.72-1.68	CT	122 (41)	85 (39)	0.39	0.84	0.57-1.24
GG	48 (16)	40 (19)	0.39	1.3	0.77-2.21	TT	46 (15)	21 (10)	0.05	0.55	0.29-1.01
<i>NLRP3</i> rs35829419						<i>IL1B</i> rs1143634					
C	585 (96)	427 (98)		1		G	489 (81)	347 (80)		1	
A	23 (4)	9 (2)	0.16	0.54	0.25-1.17	A	115 (19)	85 (20)	0.86	1.04	0.76-1.42
CC	284 (93)	209 (96)		1		GG	198 (65)	144 (67)		1	
CA	17 (6)	9 (4)	0.56	0.72	0.28-1.75	GA	93 (31)	59 (27)	0.56	0.87	0.58-1.31
AA	3 (1)	0 (0)	0.37	ND	ND	AA	11 (4)	13 (6)	0.35	1.63	0.71-3.73
<i>NLRP3</i> rs10754558						<i>IL18</i> rs1946519					
G	269 (44)	144 (33)		1		C	165 (57)	237 (54)		1	
C	339 (56)	288 (67)	0.005^a	1.59	1.23-2.05	A	125 (43)	199 (46)	0.54	1.1	0.81-1.51
GG	62 (20)	29 (13)		1		CC	51 (35)	66 (30)		1	
GC	145 (48)	86 (40)	0.43	1.27	0.38- 0.85	AC	63 (44)	105 (48)	0.33	1.29	0.77-2.14
CC	97 (32)	101 (47)	0.0036^{b, c}	2.23	1.32-3.75	AA	31 (21)	47 (22)	0.66	1.17	0.63-2.19
<i>AIM2</i> rs35130877						<i>NLRC4</i> rs212713					
T	614 (100)	436 (100)		1		T	324 (53)	234 (54)		1	
G	0 (0)	0 (0)	ND	ND	ND	C	290 (47)	200 (46)	0.75	0.95	0.74-1.23
TT	307 (100)	218 (100)		1		TT	84 (27)	63 (29)		1	
TG	0 (0)	0 (0)	ND	ND	ND	CT	156 (51)	108 (50)	0.75	0.92	0.60-1.42
GG	0 (0)	0 (0)	ND	ND	ND	CC	67 (22)	46 (21)	0.8	0.92	0.54-1.55

Table 2. Association between *CARD8* rs2043211 SNP and a higher functional disability.

Codominant model	N	HAQ mean $\pm$ SD	Dif	95%CI	<i>p</i>	AIC
A/A	61	1.32 $\pm$ 0.11	0			
A/T	58	1.41 $\pm$ 0.10	0.09	-0.20 - 0.37	0.03	309.2
T/T	8	2.13 $\pm$ 0.20	0.80	0.21 - 1.39		
Recessive model						
A/A – A/T	119	1.36 $\pm$ 0.07	0			
T/T	8	2.13 $\pm$ 0.20	0.76	0.19 - 1.33	0.01	307.5

dif, HAQ mean difference in relation to A/A genotype; CI, Confidence Interval; *p*, p-value; AIC, Akaike Information Criterion.

Supplementary data 1. Clinical features from RA patients and healthy controls.

	Ribeirão Preto city (Southeastern)		State of Pernambuco (Northeastern)	
	n (%)	Mean $\pm$ SD	n (%)	Mean $\pm$ SD
RA				
Age		55.7 $\pm$ 10.8		51.3 $\pm$ 11.7
Age at diagnosis		44.8 $\pm$ 13.2		42.1 $\pm$ 11.7
Disease time (years)		11.2 $\pm$ 8.2		9.3 $\pm$ 8.3
Females	83 (92)		122 (95)	
Males	7 (8)		6 (5)	
RF positivity	64 (71)		41 (68)	
Bone erosions	80 (89)		46 (75)	
DAS28	5.59 (2.87- 7.89) ^a		3.67 (0- 7.84) ^a	
HAQ	NA		1.66 (0- 2.88) ^a	
Controls				
Age		37.4 $\pm$ 11.3		39.2 $\pm$ 14.2
Females	76 (48)		122 (82)	
Males	82 (52)		27 (18)	
RF, Rheumatoid Factor; DAS28, Disease Activity Score in 28 joints; HAQ, Health Assessment Questionnaire; ^a Mean (minimum–maximum); NA, Not Available.				

Supplementary data 2. Polymorphisms genotyped in inflamassome genes and IL1B and IL18.

SNPs	Chromosome: Position (bp)	Gene	Alleles	Function	Aminoacid	MAF CEU ^a	MAF YRI ^a
rs12150220	17:5582047	<i>NLRP1</i>	A/T	Missense	L [Leu] ⇒ H [His]	T = 0.46	T = 0.02
rs2670660	17:5615686	<i>NLRP1</i>	A/G	Promoter region	--	G = 0.50	G = 0.39
rs35829419	1:247425556	<i>NLRP3</i>	C/A	Missense	Q [Gln] ⇒ K [Lys]	A = 0.06	A = 0
rs10754558	1:247448734	<i>NLRP3</i>	C/G	3'UTR variant	--	G = 0.36	G = 0.23
rs35130877	1:159066168	<i>AIM2</i>	T/G	Missense	E [Glu] ⇒ D [Asp]	NA	NA
rs2276405	1:159073406	<i>AIM2</i>	C/T	Missense	E [Glu] ⇒ K [Lys]	T = 0	T = 0.03
rs2043211	19:48234449	<i>CARD8</i>	A/T	Stop gain	C [Cys] ⇒ Stop	T = 0.27	T = 0.16
rs572687	11:105032992	<i>CASP1</i>	G/A	Intron variant	--	A = 0.19	A = 0.05
rs1143643	2:112830725	<i>IL1B</i>	C/T	Intron variant	--	T = 0.4	T = 0.2
rs1143634	2:112832813	<i>IL1B</i>	G/A	Synonymous codon	F [Phe] ⇒ F [Phe]	A = 0.21	A = 0.09
rs1946519	11:112164784	<i>IL18</i>	C/A	Promoter region	--	A = 0.4	A = 0.36
rs212713	2:32232468	<i>NLRC4</i>	T/C	Intron variant	--	C = 0.4	C = 0.4
rs455060	2:32250040	<i>NLRC4</i>	A/G	Synonymous codon variant	A [Ala] ⇒ A [Ala]	G = 0.3	G = 0.3

^a Minor allele frequency as reported by HapMap; NA, Not available.

5 CAPITULO II

Artigo submetido no Periódico Journal of Cellular and Molecular Medicine (Fator de impacto: 4.938, Qualis A1).

Título do artigo:

Functional study of inflammasome genes and their role in the Systemic Lupus Erythematosus development

Autores:

Heidi Lacerda Alves da Cruz¹, Jaqueline de Azêvedo Silva¹, Catarina Addobbati Jordão Cavalcanti^{1,2}, Thiago Sotero Fragoso³, Alexandre Domingues Barbosa⁴, Andréa Tavares Dantas⁴, Henrique de Ataíde Mariz⁴, Angela Luzia Branco Pinto Duarte⁴, Alessandra Pontillo⁵, Sergio Crovella^{1,2} and Paula Sandrin-Garcia^{1,2}

Afiliação:

1. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
2. Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
3. Serviço de Reumatologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, Brasil.
4. Divisão de Reumatologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.
5. Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil.

Functional study of inflammasome genes and their role in the Systemic Lupus Erythematosus development

Running title: SLE and inflammasome

Heidi Lacerda Alves da Cruz¹, Jaqueline de Azêvedo Silva¹, Catarina Addobbati Jordão Cavalcanti^{1,2}, Thiago Sotero Fragoso³, Alexandre Domingues Barbosa⁴, Andréa Tavares Dantas⁴, Henrique de Ataíde Mariz⁴, Angela Luzia Branco Pinto Duarte⁴, Alessandra Pontillo⁵, Sergio Crovella^{1,2} and Paula Sandrin-Garcia^{1,2}

¹Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil;

²Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil;

³Rheumatology Service, “Clinical Hospital”, Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil;

⁴Rheumatology Division, “Clinical Hospital”, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil;

⁵Laboratory of Immunogenetics, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil;

Corresponding author:

Paula Sandrin-Garcia

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/nº, CEP 50.670-420 Recife, Pernambuco, Brazil;

Tel. +55 81 2126-7825 e-mail: paulasandrin27@gmail.com

Conflict of interest statement and Funding

There are no conflicts of interest. This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco).

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a complex autoimmune disorder displaying heterogeneous clinical manifestations and multiple susceptibility genes involved. Several findings provide evidence about the critical role of inflammasomes in the predisposition to autoimmune diseases. Genetic variants within inflammasome-related genes and differential expression of their components have been associated with various inflammatory diseases but its relation to SLE remains unknown. In the present study, we investigated whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) and the monocytes expression profile of inflammasome genes display differences in SLE patients *versus* healthy controls. We analyzed SNPs within inflammasome genes (*NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*) and *IL-18* and *IL1B* genes in 132 SLE patients and 154 healthy controls using Taqman fluorogenic probes. We also evaluated the mRNA differential expression from the main inflammasome genes in peripheral blood derived-monocytes in a resting condition and after LPS+ATP stimulation from patients and healthy controls. Our results showed that *NLRP3* rs10754558 C allele was more frequent in SLE patients than in healthy controls, suggesting this variant conferred a greater susceptibility risk to SLE development (OR=1.5, $p=0.023$). When inflammasome SNPs were analyzed as predictors of SLE clinical manifestations, the same polymorphism was associated to lupus nephritis ($p=0.001$, OR=2.55), an important cause of morbidity and mortality in SLE individuals. We also observed that *IL1B* rs1143643 SNP was associated to less susceptibility to photosensitivity (OR=0.50, $p=0.021$). Gene expression analyses in peripheral blood derived-monocytes showed that SLE patients display a chronic activation of *NLRP1*, *CASP1* and *IL1B* genes independently of stimulus. In LPS+ATP-treated monocytes, *NLRP3* expression was also significantly higher in patients compared with controls, suggesting dysregulated transcription activation. In conclusion, our results indicate the involvement of inflammasome components in SLE pathogenesis.

Keywords: systemic lupus erythematosus, polymorphisms, inflammasome, gene expression, nephritis

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a complex autoimmune disease that predominantly affects women of childbearing age. The hallmark of SLE is the generation of autoantibodies that react with self-nuclear and cytoplasmic antigens, culminating in immunologic damage to organs, cell death and organ failure^{1,2}. Although under intense investigations, the genetic basis of human SLE is still not fully understood^{3,4,5}.

Several studies indicate that abnormal activation of genes related to the inflammatory response, resulting in an altered activation of IL-1 β and/or NF-kB, may contribute to the pathogenesis of autoimmune disorders with a strong inflammatory component, as observed in SLE⁶⁻¹¹. In the last few years, the innate immune signaling complex, called inflammasome, has garnered support for a role in triggering and maintaining SLE¹¹. Different innate immune cytoplasmic receptors, belonging to Nod-like Receptors/NLRs (i.e.: NLRP1, NLRP3, NLRC4) or PYHIN (AIM2, IFI16) families, have been described as able to assemble an inflammasome in response to pathogen- or danger-associated molecular patterns (PAMPs or DAMPs) leading to caspase-1 activation and consequent cleavage and secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18¹²⁻¹⁴.

Genetic variants in inflammasome genes have been associated to rare autoinflammatory syndromes as well as to multifactorial disorders, such as autoimmune diseases (i.e.: psoriasis, type 1 diabetes, vitiligo, celiac disease, Crohn's disease)¹⁵⁻¹⁹. Pontillo *et al.*²⁰ reported polymorphisms in the receptor gene *NLRP1* were associated to SLE in a Southeast Brazilian population and in particular with the development of specific SLE clinical presentations such as nephritis, rash and arthritis. Polymorphisms in other inflammasome components, such as *CARD8*²¹ and also within *IL18* and *IL1B* genes were

similarly associated to SLE development. Even though, the role of inflammasome in the pathogenesis of SLE remains unclear²²⁻²⁴.

So, to deeper understanding the possible impact of inflammasome genes in SLE development and its clinical phenotype, we analyzed a selected panel of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in six inflammasome genes (*NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*) and *IL1B* and *IL18*.

We also assessed in PBMC derived monocytes cell culture from SLE patients and healthy controls in order to understand inflammasome activation pathway regarding *IL-1 β* , *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *ASC* and *CASP1* genes.

Materials and Methods

Inflammasome genotyping study

Subjects

For this study, 132 SLE patients (129 women / 3 men, mean age 37.1 years $\pm$ 10.5) and 154 healthy controls (HC) (125 women / 29 men, mean age 33.5 years $\pm$ 13.4) were recruited at the Clinical Hospital of Federal University of Pernambuco (HC-UFPE), from metropolitan region of Recife (Pernambuco, Brazil). The clinical, epidemiological and laboratory profile of patients and controls is reported in Supplementary data 1.

Patients met the criteria of the American College of Rheumatology (ACR)²⁵. The control group was composed of healthy volunteers without previous family history of autoimmune diseases, as reported in appropriate questionnaire.

All procedures involving human participants were in accordance with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. All the participants provided a written informed consent approved by the local Research Ethics Committee (CAAE 03065312.3.0000.5208).

Samples and DNA isolation

Genomic DNA from SLE patients and controls was extracted from peripheral blood using DNA Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), according to manufacturer instructions.

SNPs selection and inflamassome genotyping

Thirteen SNPs in *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *CARD8*, *CASP1*, *IL1B* and *IL18* genes were selected according to previously reported association studies^{17,18} and also their functional consequence on protein activity or mRNA stability^{16,26}. The selected SNPs are reported in Supplementary data 2.

SNPs were genotyped using TaqMan assays (Thermo Fisher Scientific, California, USA). The reactions were prepared based on the manufacturer's protocol and genotyping was performed using ABI7500 Real-Time equipment (Thermo Fisher Scientific, California, USA). Allelic discrimination was executed as suggested by the manufacturer using SDS software v2.3 (Thermo Fisher Scientific, California, USA)

Statistical analysis

Genotype distribution was compared for Hardy–Weinberg (HW) equilibrium using Genotype Transposer. Genotype and allele frequencies were calculated using the Genotype Transposer software²⁷. Chi-square test was used for comparison of allele, genotype and haplotype frequencies using contingency tables as appropriate. Patients were also stratified according to the presence of clinical manifestations (rash, photosensitivity, arthritis, nephritis, ulcers, immunological, neurological and hematological alterations). All statistical analyses were carried out using the open-source R package (www.r-project.org). Haploview software was used to calculate linkage disequilibrium between polymorphisms

and to derive haplotypes. Bonferroni's correction for SLE susceptibility association was applied when *p*-value was significant ($p_{\text{Bonf}} = \text{observed } p\text{-value} \times N$, $N = \text{number of studied polymorphisms within the same gene}$).

Cell culture and Inflammasome gene expression assays

Heparinized whole blood samples were obtained from ten post-menopausal SLE female patients (mean age 42.6 ± 12 years) and ten healthy post-menopausal female controls (HC) (mean age 57.5 ± 8.14 years).

Monocytes were isolated by adherence from peripheral blood mononuclear cells obtained by centrifugation over Ficoll-Paque (Sigma-Aldrich, USA) gradient. An amount of 5×10^6 PBMCs/well was cultured in RPMI 1640 containing 10% fetal bovine serum in 24-wells microplate (Invitrogen, Life Technology, USA). For this assay, we performed biological replicates. Monocytes were stimulated with 1 $\mu\text{g/ml}$ lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich) for 4 hours and 1mM adenosine triphosphate (ATP; Sigma-Aldrich) for 15'. After incubation supernatants were collected for cytokines measurement and cells were lysed for mRNA isolation and gene expression analysis. Monocytes RNA isolation was performed using the RNeasy lysis kit (Qiagen, Life Technologies, USA), following the manufacturer's instructions. The RNA samples were stored at -80°C until used and RNA integrity analysis was performed by gel electrophoresis and quantification by Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA). cDNA synthesis was performed with SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Invitrogen, Life Technology, USA).

The major inflammasome genes, *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *ASC/PYCARD* and *CASP1*, and also *IL1B* gene were amplified with specific TaqMan Gene Expression Assays using the ABI 7500 SDS platform (Applied Biosystems, USA). *GAPDH* was the

reference gene used for normalization. Relative quantitative expression was calculated comparing SLE and healthy individual's cells (Fold change (FC) = $\text{SLE } 2^{-\Delta Cq} / \text{HC } 2^{-\Delta Cq}$) following the indications by Schmittgen and Livak, 2008²⁸. Student's t-Test was applied to compare different groups.

IL-1 β measurement

The IL-1 β secreted by monocytes was measured with ELISA (IL-1 β assays, R&D systems, USA) according to manufacturer's protocols. Results were expressed in picograms per milliliter. One-way ANOVA test with Bonferroni post-test was applied to compare IL-1 β secretion in RA and healthy controls cells as well as stimulated and resting cells.

Results

Genotyping study

Allelic and genotypic frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium in patients and controls. Minor alleles and genotypes frequencies are reported in Supplementary data 3.

NLRP3 rs10754558 C allele was significantly more frequent in SLE patients (69%) than in healthy controls (60%) and associated with greater susceptibility to SLE development ($p=0.023$, OR=1.5, 95%CI 1.4 – 2.15). The C/C genotype was also more frequent in SLE patients than in HC (46.2% vs. 38.9%, $p=0.01$, OR=2.76, 95%CI 1.21 – 6.68) as well as G/C genotype (45.5% vs. 41.6%, $p=0.02$, OR=2.54, 95%CI 1.12 – 6.15). After applying Bonferroni's correction, the association remained statistically significant ($p_{\text{Bonf}}=0.046$, 0.04 and 0.02, respectively) (Table 1).

SNPs within the other 3 inflammasome receptors genes, *NLRP1*, *NLRC4* and *AIM2* as well as the *NLRP3* rs35829419 polymorphism were not significantly associated with susceptibility to SLE ($p \geq 0.05$). The *AIM2* rs35130877 minor allele has not been found in our groups of patients and controls. The rs2043211 polymorphism in *CARD8* gene was not associated with SLE ($p=0.611$), as well as the SNP within *CASP1* ($p=0.818$). No statistically significant differences were found for rs1143643 and rs1143634 *IL1B* and rs1946519 *IL18* polymorphisms between SLE cases and healthy controls ($p \geq 0.05$) (Supplementary data 3).

When assessing haplotype formation, our results showed that *NLRP3* SNPs rs10754558 and rs35829419 were in linkage disequilibrium ($D'=0.86$) and formed 3 haplotypes. The haplotype containing rs35829419 major C allele and rs10754558 minor G allele (C-G) was more frequent in HC (37.7%) than in SLE patients (29.5%) (OR=0.68, $p=0.03$). For *IL-1B* gene, the SNPs rs1143643 and rs1143634 were also in LD ($D'=100$). The three haplotypes (C-G, T-G, C-A) were not differentially distributed between SLE and HC. *NLRP1* polymorphisms (rs12150220 and rs2670660) were also in linkage disequilibrium ($D'=78$). The four haplotypes formed (A-A, T-G, A-G and T-A) were not significantly differently distributed between SLE and HC (Table 2).

We also observed significant association between studied polymorphisms and the occurrence of patients' clinical manifestations. *NLRP3* rs10754558 C allele ($p=0.001$, OR=2.55, 95%CI 1.40-4.74) as well as G/G genotype ($p=0.04$, OR=4.59, 95%CI 0.97-29.78) were associated to lupus nephritis. *IL1B* rs1143643 minor T allele ($p=0.021$, OR=0.50, 95%CI 0.26-0.93) as well as the T/T genotype ($p=0.034$, OR=0.143, 95%CI 0.01-1.12) were associated to photosensitivity occurrence (Table 3).

When assessing the association between the observed haplotypes and SLE's manifestations, we found the *NLRP3* haplotype containing rs35829419 major C allele and

rs10754558 minor G allele (C-G) associated lower susceptibility in lupus nephritis' development (Table 4).

Inflammasome expression analyses

We investigated the differential mRNA expression of *IL-1 β* , *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *ASC* and *CASP1* genes in non-stimulated/resting and LPS+ATP-stimulated peripheral derived monocytes from SLE patients and HC. Basal, as well as LPS+ATP-stimulated monocyte gene expression was evaluated comparing SLE patients group vs. HC group.

As shown in Figure 1, when we compared the gene expression between non-stimulated SLE monocytes and non-stimulated HC monocytes, basal *NLRP1* (+3.19-fold, $p=0.037$), *CASP1* (+3.87-fold, $p=0.026$) and *IL-1 β* (+5.45-fold, $p=0.009$) genes presented a remarkable increment in SLE patients' expression levels. *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2* and *ASC* expression was not statistically different between non-stimulated SLE monocytes and HC non-stimulated monocytes.

In LPS+ATP-stimulated monocytes *NLRP1* (+8.58-fold, $p=0.005$), *CASP1* (+6.29-fold, $p=0.003$) and *IL-1 β* (+36.07-fold, $p=0.002$) genes remained upregulated in monocytes from SLE patients accompanied by *NLRP3* (+4.73-fold, $p=0.035$) (Figure 1).

We then evaluated the secretion of IL-1 β in monocytes supernatants as marker of inflammasome activation. IL-1 β secretion was incremented in SLE patients comparing to HC in non-stimulated monocytes (mean=23.14 vs. 1.13 pg/ml), after ATP (62.91 vs. 11.13pg/ml) and LPS stimulus (58.76 vs. 1.41pg/ml) and finally LPS+ATP (421.48 vs. 217.2 pg/ml). However, no statistical significance was observed ($p=0.56$, $p=0.92$, $p=0.26$ and $p=0.44$, respectively) (Figure 2).

Discussion

Studies concerning polymorphisms in inflammasome-related genes and their relation to SLE susceptibility and phenotype have been demonstrating the possible involvement of these molecules complex in SLE pathology. Herein, we demonstrate the association between *NLRP3*, one of the main components of inflammasome, and *IL1B* genes and SLE susceptibility and clinical manifestation.

In our population, the *NLRP3* rs10754558 C allele showed to confer a greater susceptibility for the development of SLE when is homozygous (OR=2.76) as well as heterozygous (OR=2.54). Interestingly the *NLRP3* rs10754558 C/C genotype was also found as associated to rheumatoid arthritis development (OR=1.77) in our population (personal communication, manuscript submitted) suggesting a role of this polymorphism in autoimmunity development. The moderate value of OR indicates the partial contribution of the associated SNP to the development of rheumatoid arthritis and SLE, multifactorial disorders.

The rs10754558 SNP is located within the 3'UTR of *NLRP3* gene. According to the PolymiRTS Database 2.0 (<http://compbio.uthsc.edu/miRSNP/>) its presence affects the binding of miRNAs. For G allele there is a binding site for miR-3529-3p and miR-549a, while for C allele there is a binding site for miR-146a-5p, miR-146b-5p, miR-589-5p and miR-7153-5p. The interference of rs10754558 SNP with the binding of these miRNAs *in vivo* remains unknown. A single study realized by Hitomi *et al.* showed by a luciferase assay using THP-1 cells that the allele-specific construct containing the G allele of rs10754558 has 1.3-fold higher activity than the other constructs containing the C allele²⁷. This increment in *NLRP3* expression, as well as its eventual effect on inflammasome activation have not been confirmed by further studies.

Our results do not fully replicate previous findings in another Brazilian SLE cohort from Southeast region, in which Pontillo *et al.*²⁰ found the association between SLE and *NLRP1* rs2670660 SNP and not between *NLRP3* polymorphism. However, the frequency of *NLRP3* rs10754558 C allele was similarly distributed in the Southeast population when comparing to Northeast one - also higher in patients (61%) than in controls (52%) - with no statistical significant differences noted. Although we did not observe a significant difference in the allele and genotype frequencies of *NLRP1* gene between SLE patients and controls, it is still possible that the molecule has an important role in the progression of the disease, as found in gene differential expression in the present study, strengthening the involvement of the inflammatory complex as a whole in the development of SLE.

The *NLRP3* rs10754558 SNP also showed association with lupus nephritis when we evaluated the susceptibility to SLE manifestations. SLE patients carrying C allele showed to have increased susceptibility to the development of nephritis, an important cause of morbidity and mortality in the disease. Also, the haplotype containing rs35829419 C allele and rs10754558 G allele showed to confer lower susceptibility to SLE and nephritis development.

NLRP3 inflammasome has been implicated in the pathogenesis of lupus nephritis in murine models for lupus. The renal NLRP3 inflammasome has been shown to be activated in (NZB × NZW) F1 lupus-prone mice²⁹ as well as up-regulated in the kidneys of MRL/lpr mice. Furthermore, the blockade of NLRP3 inflammasome attenuated the lupus nephritis in MRL/lpr mice³⁰. Zhao *et al.*³¹ also found that Thiadiazolidinone-8 treatment suppressed GSK-3 β activity and NLRP3 inflammasome activation, resulting in the significantly attenuation of severe proteinuria and renal inflammation in both lupus models. The inflammasome component NLRP3, accompanied by caspase-1, was also found increased in kidney biopsies from SLE patients with nephritis³².

We also observed the association of *IL1B* rs1143643 SNP [C>T] with photosensitivity development, one of the most frequent manifestations in SLE patients. Individuals carrying T allele presented lower susceptibility for photosensitivity occurrence. Interestingly, the same SNP was associated to lower invasiveness of melanoma, also a skin disorder³³. Altogether, we hypothesize that rs1143643 C>T may negatively affect cytokine expression leading to a higher resistance towards photosensitivity development.

When we assessed SLE gene expression profile, we found a statistical significant upregulation of *NLRP1*, *CASP1* and *IL1B* genes in non-stimulated monocytes from SLE patients when compared with healthy individuals. Although not statistically significant, *NLRP3* showed a twice upregulated in relation to controls. This result indicates that SLE patients are characterized by a chronic expression of those genes in monocyte cell culture. In LPS+ATP-treated monocytes from SLE patients, the same genes were upregulated but accompanied by *NLRP3* gene. The increased expression of *NLRP1*, *CASP1* and *IL1B* genes in stimulated monocytes may be consequence of the previous upregulation in resting monocytes.

The observed augmented expression of *NLRP3* genes in SLE cases after LPS+ATP stimulus prompt us to hypothesize that *NLRP3* transcription are dysregulated in SLE. As known, SLE patients have an increased immune complexes formation and cell death, exposing DAMPs and then stimulating NLRP3 inflammasome activation. Furthermore, autoantibodies such as anti-U1-small nuclear ribonucleoprotein and anti-double strand DNA have been shown to stimulate NLRP3 inflammasome activation^{34,35}. Our findings suggest that SLE monocytes may be dramatically sensitized to ligands and respond faster for signs of stimulation, contributing to the establishment of the exacerbated inflammation observed in the disease.

Upregulated *NLRP3* gene expression was also observed in stimulated-monocytes from rheumatoid arthritis (personal communication, manuscript submitted). Interestingly the treatment with chloroquine, widely administered in SLE and rheumatoid arthritis patients, have showed to suppress *NLRP3* expression³⁶, strengthening its role in autoimmunity development.

Yang *et al.*³⁷ found a downregulation of *NLRP3* and *NLRP1* inflammasomes in peripheral blood mononuclear cells from SLE patients and a significant negative correlation between the inflammasome expression and disease progression. Differently, our results were observed specifically in peripheral blood derived monocytes, indicating that differential inflammasome expression may be cell type-specific.

Being aware that other mechanisms influence upon IL-1 β production overall, the differences in inflammasome components and IL-1 β gene expression in monocytes from SLE patients are accompanied by IL-1 β secretion *ex vivo* monocytes. In each studied condition, the SLE monocytes secreted greater amounts of IL-1 β cytokine, including basal secretion and so indicating a constitutive secretion of the pro-inflammatory cytokine.

Two signals are traditionally required for the production and secretion of IL-1 β . The first signal, in our study LPS, induces the transcription of pro-IL-1 β and inflammasome subunits. The second signal promotes the activation of caspase-1 and also the secretion of mature IL-1 β . The second signal is provided by reduction of intracellular K⁺ generated by ATP stimulus^{38,39}. In SLE monocytes, in both LPS-stimulated and ATP-stimulated, the signals individually are sufficient to induce an augment of IL-1 β secretion (Figure 2), suggesting an inflammasome complex more prone to activation in SLE monocytes comparing to monocytes from healthy individuals.

In conclusion, our findings infer that *CASP1*, *IL1B* and *NLRP1* are chronically activated in SLE patients, as well as *NLRP3* gene is dysregulated transcript upon stimulus.

We also demonstrated that *NLRP3* rs10754558 polymorphism is associated to SLE susceptibility as well as nephritis development, an important cause of mortality in SLE. These results are useful to help understanding the role of inflamassome complex in SLE.

Acknowledgments

We would like to thank patients and control individuals for their participation. This work was supported by the following Brazilian funding agencies: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco).

References

1. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med*. 2001;345:340–350.
2. Tsokos GC, Gordon C, Smolen JS. Systemic lupus erythematosus: a companion to rheumatology. 1st ed. Philadelphia: Mosby-Elsevier. 2007.
3. Ghodke-Puranik Y, Niewold TB. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun*. 2015;64:125-36.
4. Tsao BP. The genetics of human systemic lupus erythematosus. *Trends Immunol*. 2003;24:595–602.
5. Croker JA, Kimberly RP. Genetics of susceptibility and severity in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2005;17:529–537.
6. Shinkai K, McCalmont TH, Leslie KS. Cryopyrin-associated periodic syndromes and auto inflammation. *Clin Exp Dermatol*. 2008;33:1–9.
7. Shaw PJ, Michael F, McDermott, Thirumala-Devi K. Inflammasomes and autoimmunity. *Trends Mol Med*. 2011; 17: 57–64.
8. Aksentijevich I, D Putnam C, Remmers EF, *et al*. The clinical continuum of cryopyrinopathies: novel CIAS1 mutations in North American patients and a new cryopyrin model. *Arthritis Rheum* 2007;56:1273–1285.
9. Magitta NF, Bøe Wolff AS, Johansson S, *et al*. A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. *Genes Immun*. 2009;10:120–124.
10. Yang CA, Huang ST, Chiang BL. Sex-dependent differential activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in SLE macrophages. *Rheumatology* 2015;54(2):324-31
11. Kahlenberg JM, Kaplan MJ. The inflammasome and lupus: another innate immune mechanism contributing to disease pathogenesis? *Curr Opin Rheumatol* 2014; 26:475-81.
12. Shaw PJ, McDermott MF, Kanneganti TD. Inflammasomes and autoimmunity. *Trends Mol Med*. 2011; 17(2):57–64.
13. Man SM, Kanneganti TD. Regulation of inflammasome activation. *Immunol Rev*. 2015; 265(1):6-21.
14. Ito S, Hara Y, Kubota T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Res Ther*. 2014; 12;16(1):R52.

15. Carlström M, Ekman AK, Petersson S, *et al.* Genetic support for the role of the NLRP3 inflammasome in psoriasis susceptibility. *Exp Dermatol.* 2012;21(12):932-7.
16. Roberts RL, Topless RK, Phipps-Green AJ, *et al.* Evidence of interaction of CARD8 rs2043211 with NALP3 rs35829419 in Crohn's disease. *Genes Immun.* 2010;11(4):351-6.
17. Pontillo A, Brandao L, Guimaraes R, *et al.* Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil. *Autoimmunity* 2010;43(8):583-9.
18. Pontillo A, Vendramin A, Catamo E, *et al.* The missense variation Q705K in CIAS1/NALP3/NLRP3 gene and an NLRP1 haplotype are associated with celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(3):539-44.
19. Levandowski CB, Mailloux CM, Ferrara TM, *et al.* NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1 β processing via the NLRP1 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110:2952-6.
20. Pontillo A, Girardelli M, Kamada AJ, *et al.* Polimorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 2012; 45(4):271-8.
21. Yang CA, Huang ST, Chiang BL. Sex-dependent differential activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in SLE macrophages. *Rheumatology.* 2015;54(2):324-31.
22. Camargo JF, Correa PA, Castiblanco J, *et al.* Interleukin-1beta polymorphisms in Colombian patients with autoimmune rheumatic diseases. *Genes Immun.* 2004;5(8):609e614.
23. Wang B, Zhu JM, Fan YG, *et al.* The association of IL1alpha and IL1beta polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Gene* 2013;527(1):95– 101.
24. Wen D, Liu J, Du X, *et al.* Association of interleukin-18 (–137G/C) polymorphism with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *International reviews of immunology* 2014; 33:34–44.
25. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; 40(9):1725.
26. Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, *et al.* Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;124(4):779-85.e6.
27. Cox DG, Canzian F. Genotype transposer: automated genotype manipulation for linkage disequilibrium analysis. *Bioinformatics.* 2001;17(8):738-9.

28. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008; 3(6):1101-8.
29. Tsai PY, Ka SM, Chang JM, *et al.* Epigallocatechin-3-gallate prevents lupus nephritis development in mice via enhancing the Nrf2 antioxidant pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51:744–54.
30. Zhao J, Zhang H, Huang Y, *et al.* Bay11-7082 attenuates murine lupus nephritis via inhibiting NLRP3 inflammasome and NF- κ B activation. *Int Immunopharmacol* 2013;17:116–122.
31. Zhao J, Wang H, Huang Y, *et al.* Lupus nephritis: Glycogen synthase kinase 3 β promotes renal damage through activation of NLRP3 inflammasome in lupus-prone mice. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(4):1036-44.
32. Kahlenberg JM, Thacker SG, Berthier CC, *et al.* Inflammasome activation of IL-18 results in endothelial progenitor cell dysfunction in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2011; 187:6143–6156.
33. da Silva WC, Oshiro TM, de Sá DC, *et al.* Genotyping and differential expression analysis of inflammasome genes in sporadic malignant melanoma reveal novel contribution of CARD8, IL1B and IL18 in melanoma susceptibility and progression. *Cancer Genet.* 2016;209:474-480.
34. Shin MS, Kang Y, Lee N, *et al.* U1-small nuclear ribonucleoprotein activates the NLRP3 inflammasome in human monocytes. *J Immunol.* 2012; 188:4769–4775.
35. Shin MS, Kang Y, Lee N, *et al.* Self double-stranded (ds)DNA induces IL-1 β production from human monocytes by activating NLRP3 inflammasome in the presence of anti-dsDNA antibodies. *J Immunol* 2013; 190:1407–1415.
36. Glinsky GV. Disease phenocode analysis identifies SNP guided microRNA maps (MirMaps) associated with human “master” disease genes. *Cell Cycle* 2008;23:3680–3694.
37. Yang Q, Yu C, Yang Z, *et al.* Deregulated NLRP3 and NLRP1 inflammasomes and their correlations with disease activity in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2014; 41:444-52.
38. Perregaux DG, Gabel CA. Human monocyte stimulus-coupled IL-1 β posttranslational processing: modulation via monovalent cations. *Am J Physiol.* 1998;275: C1538–1547.
39. Perregaux D, Gabel CA. Interleukin-1 β maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem.* 1994; 269:15195–15203.

TABLE LEGENDS

Table 1. Association between *NLRP3* rs10754558 SNP and SLE susceptibility.

Table 2. Distribution of studied polymorphisms haplotypes between SLE patients and healthy individuals.

Table 3. Distribution of studied polymorphisms between SLE patients with and without clinical manifestations.

Table 4. Association between *NLRP3* haplotypes and the occurrence of nephritis in SLE patients.

TITLES AND LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. *NLRP1*, *NLRP3*, *CASP1* and *IL1B* differential expression in SLE patients compared with healthy controls in LPS+ATP -stimulated and non-stimulated monocytes. The results were normalized to *GAPDH* expression. Target genes expression in healthy controls was normalized to 1 (*not reported in the graph*) and Fold Change (FC) is reported as $SLE\ 2^{-\Delta CT} / HC\ 2^{-\Delta CT}$. SLE, Systemic Lupus Erythematosus; HC, Healthy Controls; ns, non-significant; * p-value < 0.05.

Figure 2. IL-1 β secretion in healthy controls (HC) and patients (SLE) in non-stimulated monocytes; ATP-stimulated monocytes; LPS-stimulated monocytes; and LPS+ATP-stimulated monocytes.

SUPPLEMENTARY DATA CAPTION

Supplementary data 1. Characteristics from SLE patients and controls.

Supplementary data 2. Polymorphisms genotyped in inflamassome components and *IL1B* and *IL18* genes.

Supplementary data 3. Minor alleles and genotypes frequencies of studied polymorphisms in SLE patients and healthy controls.

TABLES

Table 1. Association between *NLRP3* rs10754558 SNP and SLE susceptibility.

<i>NLRP3</i> rs10754558	Controls n (%)	SLE n (%)	<i>P</i>	OR	95%CI
G	124 (40)	82 (31)	0.023^a	Ref	1.4 – 2.15
C	184 (60)	182 (69)		1.5	
GG	30 (19.5)	11 (8.3)	0.02^b	Ref	1.12 – 6.15
GC	64 (41.6)	60 (45.5)		2.54	
CC	60 (38.9)	61 (46.2)	0.01^c	2.76	1.21 – 6.68

SLE, Systemic Lupus Erythematosus; *p*, Chi-square test p-value; OR, Odds Ratio; CI, Confidence Interval; Ref, reference; ^ap-value after Bonferroni correction = 0.046; ^bp-value after Bonferroni correction = 0.04; ^cp-value after Bonferroni correction = 0.02.

Table 2. Distribution of studied polymorphisms haplotypes between SLE patients and healthy individuals.

Haplotypes	SLE (n=132)	HC (n=154)	P	OR	95%CI
<i>NLRP1</i> (D'=78) rs12150220 – rs2670660					
A-A	0.575	0.546	Ref	1	Ref
T-G	0.238	0.248	0.69	0.92	0.60 – 1.39
A-G	0.163	0.158	0.90	0.97	0.59 – 1.58
T-A	0.023	0.049	0.11	0.44	0.14 – 1.25
<i>NLRP3</i> (D'=86) rs35829419 - rs10754558					
C-C	0.682	0.592	Ref	1	Ref
C-G	0.295	0.377	0.03	0.68	0.47 – 0.98
A-G	0.018	0.031	0.29	0.51	0.13 – 1.66
<i>IL-1B</i> (D'=100) rs1143643 - rs1143634					
C-G	0.531	0.497	Ref	1	Ref
T-G	0.289	0.309	0.50	0.87	0.59 – 1.30
C-A	0.180	0.194	0.57	0.87	0.55 – 1.39
SLE, Systemic Lupus Erythematosus; HC, Healthy Controls; <i>p</i> , Chi-square test p-value; OR, Odds Ratio; CI, Confidence Interval.					

Table 3. Distribution of studied polymorphisms between SLE patients with and without clinical manifestations.

Gene/ SNP	SLE			p-value; OR[95%CI]
	Lupus Nephritis	SLE/LN ⁺ n=58(%)	SLE/LN ⁻ n=65(%)	SLE/LN ⁺ vs. SLE/LN ⁻
NLRP3/ rs10754558	G	24 (21)	52 (40)	Ref
	C	92 (79)	78 (60)	0.001; 2.55 [1.40 – 4.74]
	G/G	3 (5)	8 (12)	Ref
	G/C	18 (31)	36 (56)	1.00; 1.33 [0.27 – 8.7]
	C/C	37 (64)	21 (32)	0.04; 4.59 [0.97 – 29.78]
IL1B/ rs1143643		SLE/PS⁺ n=85(%)	SLE/PS⁻ n=38(%)	SLE/PS⁺ vs. SLE/PS⁻
	C	130 (76)	47 (62)	1
	T	40 (24)	29 (38)	0.021; 0.50 [0.26 – 0.93]
	C/C	47 (55)	13 (34)	1
	C/T	36 (42)	21 (55)	0.102; 0.477 [0.19 – 1.15]
	T/T	2 (2)	4 (11)	0.034; 0.143 [0.01 – 1.12]

SLE, Systemic Lupus Erythematosus; LN⁺, Lupus nephritis positive; LN⁻, Lupus nephritis negative; PS⁺, Photosensitivity positive; PS⁻, Photosensitivity negative; Ref, reference, OR, Odds Ratio; CI, Confidence Interval.

Table 4. Association between *NLRP3* haplotypes and the occurrence of nephritis in SLE patients.

Haplotype <i>NLRP3</i> (D'=86) rs35829419 - rs10754558	SLE		p-value; OR[95%CI]
	SLE/NL ⁺ n=55(%)	SLE/NL ⁻ n=60(%)	SLE/NL ⁺ vs.SLE/NL ⁻
C-C	0.79	0.60	Ref
C-G	0.20	0.37	0.04^a; 0.42 [0.15 – 1.05]
A-G	0.01	0.03	0.58; 0.40 [0.01 – 8.02]

SLE, Systemic Lupus Erythematosus; LN⁺, Lupus nephritis positive; LN⁻, Lupus nephritis negative; Ref, reference, OR, Odds Ratio; CI, Confidence Interval.

FIGURES

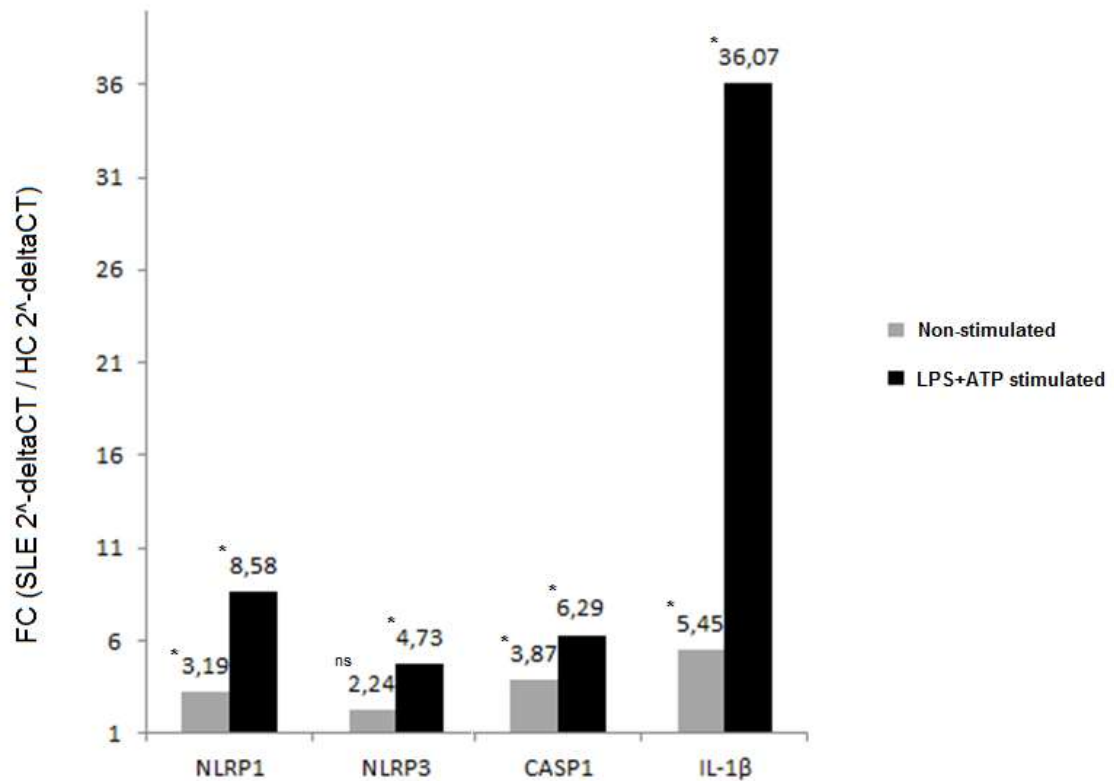


Figure 1. *NLRP1*, *NLRP3*, *CASP1* and *IL1B* differential expression in SLE patients compared with healthy controls in LPS+ATP -stimulated and non-stimulated monocytes. The results were normalized to *GAPDH* expression. Target genes expression in healthy controls was normalized to 1 (not reported in the graph) and Fold Change (FC) is reported as $SLE\ 2^{-\Delta\Delta Cq} / HC\ 2^{-\Delta\Delta Cq}$. SLE, Systemic Lupus Erythematosus; HC, Healthy Controls; ns, non-significant; * p-value < 0.05.

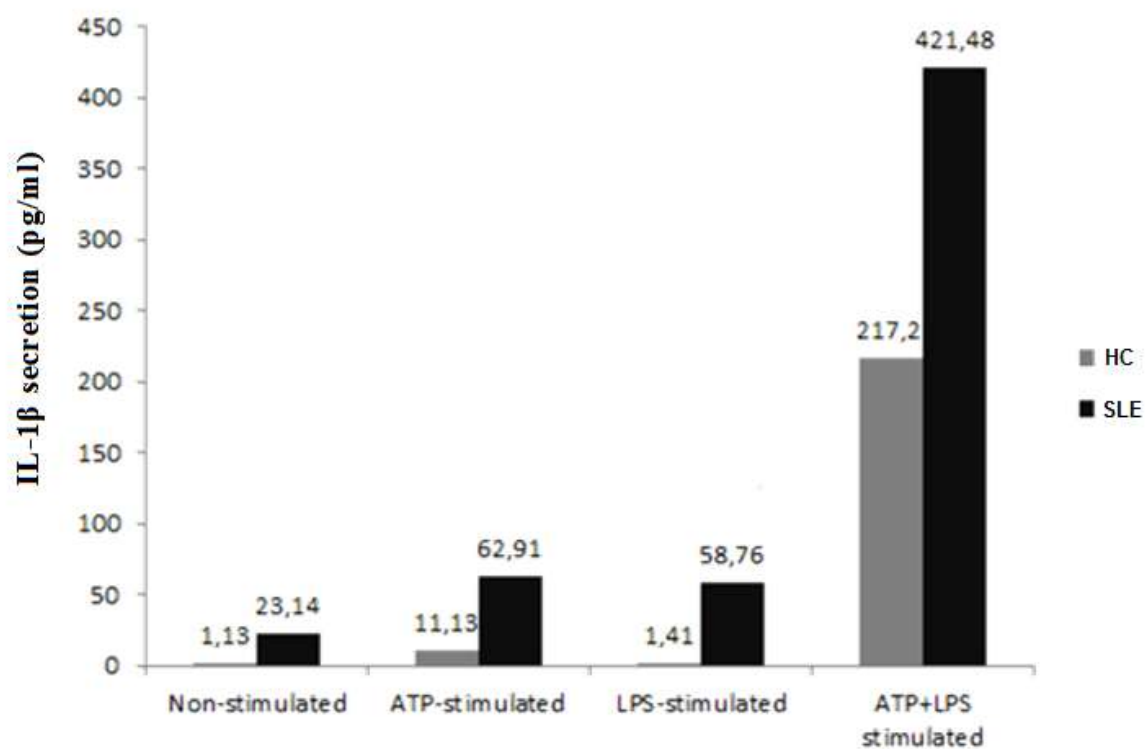


Figure 2. IL-1 β secretion in healthy controls (HC) and patients (SLE) in non-stimulated monocytes; ATP-stimulated monocytes; LPS-stimulated monocytes; and LPS+ATP-stimulated monocytes.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data 1. Characteristics from SLE patients and controls.

Variable	SLE cases n=132 (%)	Controls n=154 (%)
Gender		
Male	3 (2)	29 (19)
Female	129 (98)	125 (81)
Mean Age	37.1 ($\pm 10,5$)	33.5 ($\pm 13,4$)
Clinical Manifestations		
Cutaneous	89 (64%)	
Photosensitivity	85 (61%)	
Lupus arthritis	88 (63%)	
Ulcers	29 (20%)	
Hematologic	82 (59%)	
Nephritis	58 (42%)	
Neurological	12 (8%)	
FAN (Antinuclear Factor)	114 (82%)	
Immunologic	44 (32%)	
Anti-DNA	37 (27%)	

Supplementary data 2. Polymorphisms genotyped in inflamassome components and *IL1B* and *IL18* genes.

SNPs	Chromosome: Position (bp)	Gene	Alleles	Function	Aminoacid	MAF CEU ^a	MAF YRI ^a
rs12150220	17:5582047	<i>NLRP1</i>	A/T	Missense	L [Leu] ⇒ H [His]	T = 0.46	T = 0.02
rs2670660	17:5615686	<i>NLRP1</i>	A/G	Promoter region	--	G = 0.50	G = 0.39
rs35829419	1:247425556	<i>NLRP3</i>	C/A	Missense	Q [Gln] ⇒ K [Lys]	A = 0.06	A = 0
rs10754558	1:247448734	<i>NLRP3</i>	C/G	3'UTR variant	--	G = 0.36	G = 0.23
rs35130877	1:159066168	<i>AIM2</i>	T/G	Missense	E [Glu] ⇒ D [Asp]	NA	NA
rs2276405	1:159073406	<i>AIM2</i>	C/T	Missense	E [Glu] ⇒ K [Lys]	T = 0	T = 0.03
rs2043211	19:48234449	<i>CARD8</i>	A/T	Stop gain	C [Cys] ⇒ Stop	T = 0.27	T = 0.16
rs572687	11:105032992	<i>CASP1</i>	G/A	Intron variant	--	A = 0.19	A = 0.05
rs1143643	2:112830725	<i>IL1B</i>	C/T	Intron variant	--	T = 0.4	T = 0.2
rs1143634	2:112832813	<i>IL1B</i>	G/A	Synonymous codon	F [Phe] ⇒ F [Phe]	A = 0.21	A = 0.09
rs1946519	11:112164784	<i>IL18</i>	C/A	Promoter region	--	A = 0.4	A = 0.36
rs212713	2:32232468	<i>NLRC4</i>	T/C	Intron variant	--	C = 0.4	C = 0.4
rs455060	2:32250040	<i>NLRC4</i>	A/G	Synonymous codon variant	A [Ala] ⇒ A [Ala]	G = 0.3	G = 0.3

^a Minor allele frequency as reported by HapMap; NA, Not available.

Supplementary data 3. Minor alleles and genotypes frequencies of studied polymorphisms in SLE patients and healthy controls.

Gene	SNP ID	Minor Allele/ Genotype	SLE (n=132)	HC (n=154)	<i>p</i>	OR	95%CI
<i>NLRP1</i>	rs2670660	G	100 (0.40)	110 (0.41)	0.982	0.982	0.68 – 1.41
		A/A-A/G-G/G	43-62-19	47-66-22	0.985		
<i>NLRP1</i>	rs12150220	T	65 (0.26)	87 (0.30)	0.388	0.837	0.58 – 1.24
		A/A-A/T-T/T	68-47-9	75-55-16	0.607		
<i>NLRP3</i>	rs35829419	A	6 (0.02)	13 (0.04)	0.609	0.731	0.21 – 2.33
		C/C-C/A-A/A	126-6-0	143-9-2	-	-	-
<i>NLRC4</i>	rs455060	G	83 (0.33)	111 (0.37)	0.369	0.837	0.57 – 1.21
		A/A-A/G-G/G	58-51-16	59-69-21	0.526		
<i>AIM2</i>	rs2276405	T	5 (0.02)	6 (0.02)	1	0.873	0.20 – 3.48
		C/C-C/T-TT	112-5-0	117-6-0	1		
<i>AIM2</i>	rs35130877	G	0	0	-	-	-
		T/T-G/T-T/T	126-0-0	152-0-0	-		
<i>CARD8</i>	rs2043211	T	63 (0.27)	73 (0.24)	0.611	1.10	0.72 – 1.68
		A/A-A/T-T/T	58-51-6	84-59-7	0.681		
<i>CASP1</i>	rs572687	A	42 (0.16)	50 (0.18)	0.818	1.07	0.66 – 1.72
		G/G-A/G-A/A	89-32-5	95-44-3	0.439		
<i>IL1B</i>	rs114363	T	74 (0.29)	86 (0.31)	0.705	0.928	0.62 – 1.36
		C/C-C/T-T/T	60-58-8	67-58-14	0.496		
<i>IL1B</i>	rs114364	A	42 (0.18)	53 (0.20)	0.732	0.916	0.56 – 1.47
		G/G-A/G-A/A	79-28-7	87-41-6	0.555		
<i>IL18</i>	rs1946519	A	93 (0.40)	114 (0.43)	0.648	0.918	0.63 – 1.33
		C/C-A/C-A/A	41-53-20	46-60-27	0.876		

SLE, Systemic Lupus Erythematosus; HC, Healthy Controls; *p*, Chi-square test p-value; OR, Odds Ratio; CI, Confidence Interval.

6 DISCUSSÃO GERAL

Com a hipótese de que fatores genéticos possam acarretar alterações na ativação do inflamassoma e então contribuir com o desenvolvimento da AR e do LES, o presente estudo avaliou a associação de polimorfismos genéticos nos principais genes do inflamassoma e também nos genes *IL1B* e *IL18* com a susceptibilidade à AR e ao LES.

No nosso estudo, observamos a associação do alelo C quando em homozigose do polimorfismo rs10754558 do gene *NLRP3* com o aumento do risco de 1,77 e 2,76 ao desenvolvimento da AR e do LES, respectivamente. O valor da OR sugere uma contribuição parcial do SNP para o desenvolvimento dessas doenças, corroborando a natureza multifatorial e poligênica como discutido anteriormente. Interessantemente, o mesmo polimorfismo mostrou-se associado ao desenvolvimento de nefrite nos pacientes com LES, uma das manifestações mais severas da doença.

O polimorfismo associado do gene *NLRP3* está localizado na região regulatória 3' do *NLRP3*, tendo assim um possível impacto na expressão do gene. Análises *in silico* realizadas no presente estudo encontraram uma possível alteração no sítio de ligação de miRNAs, entretanto o seu impacto *in vitro* não foi explorado no presente estudo.

Quando avaliamos a associação dos SNPs com as características clínicas e laboratoriais dos pacientes, foi observada a associação do polimorfismo rs2043211 do gene *CARD8*, denominado p.C10X, com a severidade da AR. A mensuração da severidade foi realizada pelo índice clínico HAQ, o qual, conforme abordado anteriormente, é uma medida genérica da escala de dor utilizada para avaliar a incapacidade funcional do paciente (Ramey *et al.*, 1996). Uma vez que

essa incapacidade é em geral consequência das sequelas da doença, os valores de HAQ correlacionam-se então com a severidade da AR.

Os pacientes com AR homozigotos para o alelo T do SNP do gene *CARD8* apresentaram maior incapacidade funcional mensurada pelo HAQ. Esse polimorfismo introduz um códon de parada prematuro, resultando na produção de uma proteína truncada (Bagnall *et al.*, 2008). Apesar do papel da *CARD8* ainda não estar claro, propõem-se que atue como moduladora da ativação do NLRP3 e que o polimorfismo C10X acarrete uma maior secreção de IL-1 β (Roberts *et al.*, 2010).

Em outras populações, tais como da Espanha (Fontalba *et al.*, 2007) e Suíça (Kastbom *et al.*, 2010), também foi encontrada associação entre o polimorfismo do gene *CARD8* e a severidade da doença, sugerindo então um papel da *CARD8* na regulação da inflamação independentemente dos fatores geográficos e étnicos.

Esse achado é de grande interesse para o possível uso desse polimorfismo com um marcador genético no prognóstico da AR pois sendo uma doença com sequelas irreversíveis, com elevado impacto na capacidade funcional e laboral do indivíduo, é de extrema importância que seja estabelecido um tratamento eficaz antes mesmo que os sinais clínicos severos da doença se estabeleçam.

Nos pacientes com LES, também foi observada a associação entre o alelo T do polimorfismo rs1143643 no gene da IL-1 β com a proteção ao desenvolvimento de fotossensibilidade, uma das manifestações mais comuns do LES. Interessantemente, a mesma alteração genética foi associada a um melanoma menos invasivo, levando-nos a sugerir que esse polimorfismo pode alterar a atuação da IL-1 β causando uma proteção a alterações dermatológicas.

Em relação à expressão diferencial dos principais genes do inflamassoma, os genes *CASP1*, *IL1B* e *IL1R* mostraram uma maior expressão nos monócitos de pacientes com AR independentemente de estímulo quando comparados aos monócitos de indivíduos saudáveis. Em pacientes com LES, observamos a expressão aumentada dos genes *NLRP1*, *CASP1* e *IL1B* em monócitos não-estimulados, sugerindo uma ativação crônica desses genes independente de estímulo *in vitro*.

Em monócitos estimulados com LPS e ATP, os mesmos genes mostraram uma maior expressão comparando pacientes vs. controles, entretanto acompanhados pelos genes *NLRP3* e *NLRP4* em monócitos de pacientes com AR e apenas pelo *NLRP3* em monócitos de pacientes com LES. Podemos sugerir que a maior expressão desses genes após o estímulo é possivelmente consequência da desregulação na sua transcrição, o que pode contribuir para a inflamação exacerbada observada na doença.

Os achados de expressão diferencial dos genes do inflamassoma em monócitos de pacientes com AR e com LES foram acompanhados pelos níveis elevados de IL-1 β . Os monócitos dos pacientes tanto com AR como com LES estimulados ou não com LPS e ATP, secretaram níveis mais elevados de IL-1 β do que indivíduos saudáveis.

Os níveis mais elevados de IL-1 β basal nos pacientes quando comparados aos controles saudáveis indicam uma secreção constitutiva da citocina pro-inflamatória. Em ambos grupos de pacientes, apenas o estímulo com LPS ou ATP foi suficiente para um aumento relevante da secreção de IL-1 β , ao contrário dos indivíduos saudáveis que mostraram um maior aumento após o estímulo com

LPS+ATP, sugerindo uma maior propensão do inflamassoma à ativação nos pacientes com AR e LES.

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, foi estabelecida a associação do *NLRP3* com o desenvolvimento tanto do LES como da AR, sugerindo um importante papel desse gene no desenvolvimento da autoimunidade. Encontramos também a associação de polimorfismos do inflamassoma com o fenótipo do LES e da AR. Foi observada a associação do polimorfismo C10X do gene *CARD8* com a severidade da AR mensurada pelo índice clínico HAQ e do polimorfismo rs10754558 do *NLRP3* com o desenvolvimento da nefrite, um importante fator de mortalidade para os pacientes com LES, sendo então essas variantes genéticas potenciais marcadores para o prognóstico dessas doenças. Encontramos também a associação entre o polimorfismo rs1143643 no gene da IL-1 β com o desenvolvimento da fotossensibilidade nos pacientes com LES.

Também observamos em monócitos de pacientes com AR que os genes *CASP1*, *IL1B* e *IL1R* estão cronicamente ativados, enquanto os genes *NLRP3* e *NLRC4* apresentam uma expressão desregulada quando estimulados com LPS+ATP. Em monócitos de pacientes com LES, observamos a expressão aumentada dos genes *NLRP1*, *CASP1* e *IL1B* independente de estímulos, enquanto o gene *NLRP3* também apresentou uma expressão aumentada frente ao estímulo com LPS e ATP. Dessa forma este trabalho contrubuiu, para um melhor entendimento do papel dos genes do inflamassoma no desenvolvimento da AR e do LES.

REFERÊNCIAS

Agmon-Levin N and Shoenfeld Y (2009) Prediction and prevention of autoimmune skin disorders. *Arch Dermatol Res* 301: 57–64.

Aho K, Kaipiainen-Seppanen O, Heliovaara M and Klaukka T (1998) Epidemiology of rheumatoid arthritis in Finland. *Semin Arthritis Rheum* 27:325 – 34.

Akar S, Birlik M, Gurler O, Sari I, Onen F, Manisali M, Tirpan K, Demir T, Meral M and Akkoc N (2004) The prevalence of rheumatoid arthritis in an urban population of Izmir-Turkey. *Clin Exp Rheumatol* 22: 416 – 20.

Al Dhanhani AM, Gignac MAM, Jiandong S and Fortin PR (2009) Work disability in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 61(3): 378–385.

Alamanos Y and Drosos A (2005) Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 4(3):130-6.

Alamanos Y, Voulgari P and Drosos A (2006) Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 36: 182-188.

Alarcon R e Andrade L (2007) Anticorpos Antiproteínas Citrulinadas e a Artrite Reumatóide. *rev bras reumatol* 47(3):180-7.

Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP and Cohen MD (2010) 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 62(9):2569-81.

Aletaha D, Ward M, Machold K, Nell V, Stamm T and Smolen J (2005) Remission and active disease in rheumatoid arthritis: defining criteria for disease activity states. *Arthritis Rheum* 52(9):2625-36.

Alten R, Gram H, Joosten LA, van den Berg WB, Sieper J, Wassenberg S, Burmester G, van Riel P, Diaz-Lorente M and Bruin GJ *et al.* (2008) The human anti-IL-1 beta monoclonal antibody ACZ885 is effective in joint inflammation models in mice and in a proof-of-concept study in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10(3):R67.

Apostolidis SA, Lieberman LA, Kis-Toth K, Crispín JC and Tsokos GC. (2011) The dysregulation of cytokine networks in systemic lupus erythematosus. *J Interferon Cytokine Res* 31(10):769-779.

Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA and Harley JB (2003) Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 349(16):1526-33.

Arend W (2001) Physiology of cytokine pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatism* 45(1):101-6.

Aringer M and Smolen J (2005) Cytokine expression in lupus kidneys. *Lupus* 14(1):13-8.

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH and Luthra HS *et al.* (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315-24.

Arnson Y, Shoenfeld Y and Amital H (2010) Effects of tobacco on immunity, inflammation and autoimmunity. *J Autoimmun* 34: 258–265.

Assis MR e Baaklini CE (2009) Como Diagnosticar e Tratar Lupus eritematoso sistêmico. Revista Brasileira de Medicina.

Bagnall RD, Roberts RG, Mirza MM, Torigoe T, Prescott NJ and Mathew CG (2008) Novel isoforms of the CARD8 (TUCAN) gene evade a nonsense mutation. *Eur J Hum Genet* 16:619–25.

Barra L, Pope J, Bessette L, Haraoui B and Bykerk V (2011) Lack of seroconversion of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide in patients with early inflammatory arthritis: a systematic literature review. *Rheumatology (Oxford)* 50: 311–16.

Bartok B and Firestein G (2010) Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 233(1):233-55.

Bassi N, Luisetto R, Ghirardello A, Gatto M, Valente M, Della Barbera M, Nalotto L, Punzi L and Doria A (2015) 17- β -estradiol affects BLYS serum levels and the nephritogenic autoantibody network accelerating glomerulonephritis in NZB/ WF1 mice. *Lupus* 24: 382-91.

Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM and Spoerke JM *et al.* (2004) A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 75:330–37.

Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J and Pascual V (2003) Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 197(6):711-23.

Bertolo M, Costallat L, Persoli L e Costa F (2001). Alelos HLA-DRB1 e prognóstico da artrite reumatoide em pacientes brasileiros. *Rev Bras Reumatol* 41(3):151-6.

Blomgran R, Patcha Brodin V, Verma D, Bergström I, Söderkvist P, Sjöwall C, Eriksson P, Lerm M, Stendahl O and Särndahl E (2012) Common genetic variations in the NALP3 inflammasome are associated with delayed apoptosis of human neutrophils. *PLoS One* 7(3):e31326.

Bonelli M, von Dalwigk K, Savitskaya A, Smolen JS and Scheinecker C (2008) Foxp3 expression in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic analysis. *Ann Rheum Dis* 67(5):664-71.

Borchers AT, Leibushor N, Naguwa SM, Cheema GS, Shoenfeld Y, Gershwin ME (2012) Lupus nephritis: a critical review. *Autoimmun Rev* 12 (2):174e194.

Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P, Nuki G, Pavelka K, Rau R and Rozman B *et al.* (1998) Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 41:2196–204.

Camargo JF, Correa PA, Castiblanco J and Anaya JM (2004) Interleukin-1beta polymorphisms in Colombian patients with autoimmune rheumatic diseases. *Genes Immun* 5(8):609e614.

Canhão H, Rodrigues AM, Santos MJ, Carmona-Fernandes D, Bettencourt BF, Cui J, Rocha FL, Canas Silva J, Polido-Pereira J and Pereira Silva JA *et al.* (2015) TRAF1/C5 but not PTPRC variants are potential predictors of rheumatoid arthritis response to anti-tumor necrosis factor therapy. *Biomed Res Int* 2015:490295.

Carlström M, Ekman A, Petersson S, Söderkvist P and Enerbäck C (2012) Genetic support for the role of the NLRP3 inflammasome in psoriasis susceptibility. *Exp Dermatol* 21(12):932-7.

Castro-Santos P e Diaz-Pena R (2016) Genética da artrite reumatoide: é necessário um novo impulso em populações latino-americanas. *Rev. Bras. Reumatol* (56) 2:171-77.

Chakravarty EF, Bush TM, Manzi S, Clarke AE and Ward MM (2007) Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis Rheum* 56(6):2092-4.

Cham CM, Ko K and Niewold TB (2012) Interferon regulatory factor 5 in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol* 2012:780436.

Chang X, Xia Y, Pan J, Meng Q, Zhao Y and Yan X (2013) PADI2 is significantly associated with rheumatoid arthritis. *PLoS One* 8(12):e81259.

Chavele KM and Ehrenstein MR (2011) Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett* 585(23):3603-10.

Chen G and Nunez G (2010) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol* 10:826–37.

Chen JY, Wang CM, Chang SW, Cheng CH, Wu YJ, Lin JC, Yang B, Ho HH and Wu J (2014) Association of FCGR3A and FCGR3B copy number variations with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in Taiwanese patients. *Arthritis Rheumatol* 66(11):3113-21.

Chibnik L, Keenan B, Cui J, Liao K, Costenbader K, Plenge R and Karlson E (2011) Genetic risk score predicting risk of rheumatoid arthritis phenotypes and age of symptom onset. *PLoS One* 6(9):e24380.

Chistiakov DA and Turakulov RI (2003) CTLA-4 and Its Role in Autoimmune Thyroid Disease. *J. Mol. Endocrinol* 31(1):21-36.

Choulaki C, Papadaki G, Repa A, Kampouraki E, Kambas K, Ritis K, Bertsias G, Boumpas DT and Sidiropoulos P (2015) Enhanced activity of NLRP3 inflammasome in peripheral blood cells of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 17:257.

Chu ZT, Tsuchiya N, Kyogoku C, Ohashi J, Qian YP, Xu SB, Mao CZ, Chu JY and Tokunaga K (2004) Association of Fcy receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations. *Tissue Antigens* 63(1):21-7.

Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, Ma L, Watowich SS, Jetten AM and Tian Q *et al.* (2009) Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling *Immunity* 30(4): 576e587.

Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I and Vrabie CD (2011) Manifestations of systemic lupus erythematosus. *Maedica* 6(4):330-6.

Contassot E, Beer HD and French LE (2012) Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss Med Wkly* 142:w13590.

Cooper GS, Gilbert KM, Greidinger EL, James JA, Pfau JC, Reinlib L, Richardson BC and Rose NR (2008) Recent advances and opportunities in research on lupus: environmental influences and mechanisms of disease. *Environ Health Perspect* 116(6):695-702.

Crispín JC, Liossis SN, Kis-Toth K, Lieberman LA, Kyttaris VC, Juang YT and Tsokos GC (2010) Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med* 16(2):47-57.

Dai S, Han X, Zhao D, Shi Y, Liu Y and Meng J (2003) Prevalence of rheumatic symptoms, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and gout in Shanghai, China: a COPCORD study. *J Rheumatol* 30:2245 – 51.

de Azevêdo Silva J, Monteiro Fernandes K, Três Pancotto JA, Sotero Fragoso T, Donadi EA, Crovella S and Sandrin-Garcia P (2013) Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus clinical manifestations. *Lupus* 22(11):1110-7

Delgado-Vega A, Sánchez E, Löfgren S, Castillejo-López C and Alarcón-Riquelme ME (2010) Recent Findings on Genetics of Systemic Autoimmune Diseases. *Curr Opin Immunol* 22(6):698-705.

Deng Y and Tsao BP (2010) Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. *Nat Rev Rheumatol* 6(12):683-92.

Doran M, Pond G, Crowson C, O'Fallon W and Gabriel S (2002) Trends in incidence and mortality in rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, over a forty-year period. *Arthritis Rheum* 46:625 – 31.

Draborg AH, Duus K and Houen G (2012) Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Clin Dev Immunol* 2012:370516

Drosos A, Alamanos I, Voulgari P, Psychos D, Katsaraki A, Papadopoulos I, Dimou G and Siozos C (1997) Epidemiology of adult rheumatoid arthritis in northwest Greece 1987–1995. *J Rheumatol* 24:2129 – 33.

Duarte AA (2005) Fator antinúcleo na dermatologia. *Anais Brasileiro de Dermatologia* 4(80): 387-394.

Elshazli R and Settin A (2015) Association of PTPN22 rs2476601 and STAT4 rs7574865 polymorphisms with rheumatoid arthritis: A meta-analysis update. *Immunobiology* 220(8):1012-24.

Enyedy EJ, Mitchell JP, Nambiar MP and Tsokos GC (2001) Defective FcγRIIb1 signaling contributes to enhanced calcium response in B cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 101(2):130-5.

Esfandiari E, McInnes IB, Lindop G, Huang FP, Field M, Komai-Koma M., Wei X and Liew FY (2001) A proinflammatory role of IL-18 in the development of spontaneous autoimmune disease. *J Immunol* 167:5338-47.

Fanciulli M, Norsworthy PJ, Petretto E, Dong R, Harper L, Kamesh L, Heward JM, Gough SC, de Smith A and Blakemore AI *et al.* (2007) FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. *Nat Genet* 39(6):721-3.

Fattah SA, Ghattas MH, Saleh SM and Abo-Elmatty DM (2017) Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 gene polymorphism is related to rheumatoid arthritis in Egyptian population. *Arch Physiol Biochem* 123(1):50-53.

Favilli F, Anzilotti C, Martinelli L, Quattroni P, De Martino S, Pratesi F, Neumann D, Beermann S, Novick D and Dinarello CA *et al.* (2009) IL-18 activity in systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* 1173:301-9.

Fernández-Nebro A, Rúa-Figueroa Í, López-Longo FJ, Galindo-Izquierdo M, Calvo-Alén J, Olivé-Marqués A, Ordóñez-Cañizares C, Martín-Martínez MA, Blanco R and Melero-González R *et al.* (2015) Cardiovascular events in systemic lupus erythematosus: a nationwide study in Spain from the RELESSER registry. *Medicine (Baltimore)* 94: e1183.

Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC, De Jager PL, Goyette P, Plenge RM, Vyse TJ and Rioux JD (2008) Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS Genet* 4:e1000024.

Ferraccioli G and Zizzo G (2011) The potential role of Th17 in mediating the transition from acute to chronic autoimmune inflammation: rheumatoid arthritis as a model, *Discov Med* 11(60):413e424.

Fontalba A, Martinez-Taboada V, Gutierrez O, Pipaon C, Benito N, Balsa A, Blanco R, Fernandez-Luna JL (2007) Deficiency of the NF-kappaB inhibitor caspase activating and recruitment domain 8 in patients with rheumatoid arthritis is associated with disease severity. *J Immunol* 179:4867–73.

Gabriel S, Crowson C and O'Fallon W (1999) The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, 1955–1985. *Arthritis Rheum* 42:415 – 20.

Gabriel S, Crowson C, Kremers H, Doran M, Turesson C, O'Fallon W and Matteson E (2003) Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum* 48:54 – 8.

Gateva V, Sandling JK, Hom G, Taylor KE, Chung SA, Sun X, Ortmann W, Kosoy R, Ferreira RC and Nordmark G *et al.* (2009) A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 41(11):1228-33.

Ghodke-Puranik Y and Niewold TB (2015) Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun* 64:125-36.

Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, Bacon P, Bombardieri S, Hanly J and Hay E *et al.* (1996) The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 39(3):363-9.

Glinsky GV (2008) SNP-guided microRNA maps (MirMaps) of 16 common human disorders identify a clinically accessible therapy reversing transcriptional aberrations of nuclear import and inflammasome pathways. *Cell Cycle* 7:3564–3576.

Goeldner I, Skare TL, Reason ITM and Utiyama RR (2011) Rheumatoid arthritis: a current view. *J Bras Patol Med Lab* 47(5):495–503.

Goh YP, Naidoo P and Ngian GS (2012) Imaging of systemic lupus erythematosus. Part II: Gastrointestinal, renal, and musculoskeletal manifestations. *Clin Radiol* 68(2):192-202

Gorjestani S, Rider V, Kimler BF, Greenwell C and Abdou NI (2008) Extracellular signal-regulated kinase 1/2 signalling in SLE T cells is influenced by oestrogen and disease activity. *Lupus* 17(6):548-54.

Graham RR, Cotsapas C, Davies L, Hackett R, Lessard CJ, Leon JM, Burt NP, Guiducci C, Parkin M and Gates C *et al.* (2008) Genetic variants near TNFAIP3 on 6q23 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 40(9):1059-61.

Gregersen P, Silver J and Winchester R (1987) The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30(11):1205-13.

Gregersen PK and Olsson LM (2009) Recent advances in the genetics of autoimmune disease. *Annu Rev Immunol* 27:363-91.

Gu E, Lu J, Xing D, Chen X, Xie H, Liang J and Li L (2015) Rs7574865 polymorphism in signal transducers and activators of transcription 4 gene and rheumatoid arthritis: an updated meta-analysis of 28 case-control comparisons. *Int J Rheum Dis* 18(1):3-16.

Guillemin F, Briancon S, Klein J, Sauleau E and Pourel J (1994) Low incidence of rheumatoid arthritis in France. *Scand J Rheumatol* 23:264 – 8.

Han JW, Zheng HF, Cui Y, Sun LD, Ye DQ, Hu Z, Xu JH, Cai ZM, Huang W and Zhao GP *et al.* (2009) Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 41(11):1234-7.

Hatef MR, Sahebari M, Rezaieyazdi Z, Nakhjavani MR and Mahmoudi M (2013) Stronger Correlation between Interleukin 18 and Soluble Fas in Lupus Nephritis Compared with Mild Lupus. *ISRN rheumatology* 2013:850851.

Hess EV (2002). Environmental chemicals and autoimmune disease: cause and effect. *Toxicology* 181-182: 265–270.

Hitchon C and El-Gabalawy H (2011) The synovium in rheumatoid arthritis. *Open Rheumatol J.* 5:107-14.

Hochberg MC (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40(9):1725.

Honda K and Littman DR (2012) The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annu Rev Immunol* 30: 759–95.

Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, Schreuder GM, Wener M, Breedveld FC and Ahmad N *et al.* (2005) Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum* 52(11):3433-8.

Ippagunta SK, Brand DD, Luo J, Boyd KL, Calabrese C, Stienstra R, Van de Veerdonk FL, Netea MG, Joosten LA and Lamkanfi M *et al.* (2010) Inflammasome-independent role of apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) in T cell priming is critical for collagen-induced arthritis. *J Biol Chem* 285:12454–62.

James E, Moustakas A, Bui J, Papadopoulos G, Bondinas G, Buckner J and Kwok W (2010) HLA-DR1001 presents “altered-self” peptides derived from joint-associated proteins by accepting citrulline in three of its binding pockets. *Arthritis Rheum* 62: 2909–18.

Jiang Y, Genant HK, Watt I, Cobby M, Bresnihan B, Aitchison R and McCabe D (2000) A multicenter, doubleblind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of genant and larsen scores. *Arthritis Rheum* 43(5):1001-9.

Jolly M (2005) How Does Quality of Life of Patients with Systemic Lupus Erythematosus Compare with that of Other Common Chronic Illnesses? *J Rheumatol* 32(9):1706-8.

Joosten L, Helsen M, Saxne T, van De Loo F, Heinegard D and van Den Berg W (1999) IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation. *J Immunol* 163:5049–55.

Juang YT, Wang Y, Solomou EE, Li Y, Mawrin C, Tenbrock K, Kyttaris VC and Tsokos GC (2005) Systemic lupus erythematosus serum IgG increases CREM binding to the IL-2 promoter and suppresses IL-2 production through CaMKIV. *J Clin Invest* 115(4):996-1005.

Kahlenberg JM, Thacker SG, Berthier CC, Cohen CD, Kretzler M and Kaplan MJ (2011) Inflammasome Activation of IL-18 Results in Endothelial

Progenitor Cell Dysfunction in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* 187(11):6143-56.

Kahlenberg JM, Yalavarthi S, Zhao W, Hodgins JB, Reed TJ, Tsuji NM and Kaplan MJ (2014) An essential role for caspase-1 in the induction of murine lupus and its associated vascular damage. *Arthritis Rheum* 66(1):153–62.

Kariuki SN, Kirou KA, MacDermott EJ, Barillas-Arias L, Crow MK and Niewold TB (2009) Cutting edge: autoimmune disease risk variant of STAT4 confers increased sensitivity to IFN- α in lupus patients in vivo. *J Immunol* 182:34–38.

Kastbom A, Ärlestig L and Rantapää-Dahlqvist S (2015) Genetic Variants of the NLRP3 Inflammasome Are Associated with Stroke in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* 42(10):1740-5.

Kastbom A, Johansson M, Verma D, Söderkvist P and Rantapää-Dahlqvist S (2010) CARD8 p.C10X polymorphism is associated with inflammatory activity in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 69(4):723-6.

Kastbom A, Verma D, Eriksson P, Skogh T, Wingren G and Soderkvist P (2008) Genetic variation in proteins of the cryopyrin inflammasome influences susceptibility and severity of rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Rheumatology (Oxford)* 47:415–7.

Kelly JA, Kelley JM, Kaufman KM, Kilpatrick J, Bruner GR, Merrill JT, James JA, Frank SG, Reams E and Brown EE *et al.* (2008) Interferon regulatory factor-5 is genetically associated with systemic lupus erythematosus in African Americans. *Genes Immun* 9(3):187–194.

Kilmon MA, Wagner NJ, Garland AL, Lin L, Aviszus K, Wysocki LJ and Vilen BJ (2007) Macrophages prevent the differentiation of autoreactive B cells by secreting CD40 ligand and interleukin-6. *Blood* 110(5):1595-602.

Kinne R, Stuhlmüller B and Burmester G (2007) Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res Ther* 9(6):224.

Klareskog L, Malmstrom V, Lundberg K, Padyukov L and Alfredsson L (2011) Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Semin Immunol* 23: 92–98.

Klumb EM, Pinto AC, Jesus GR, Araujo M Jr, Jascione L, Gayer CR, Ribeiro FM, Albuquerque EM and Macedo JM (2010) Are women with lupus at higher risk of HPV infection? *Lupus* 19: 1485–1491.

Koopman W (2001) Prospects for autoimmune disease: Research advances in rheumatoid arthritis. *JAMA* 285(5):648-50.

Korman BD, Kastner DL, Gregersen PK and Remmers EF (2008) STAT4: genetics, mechanisms, and implications for autoimmunity. *Curr Allergy Asthma Rep* 8:398–403.

Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, Fukazawa T, Jansen MD, Hashimoto H and van de Winkel JG *et al.* (2002) Fc γ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. *Arthritis Rheum* 46(5):1242-54.

Kyttaris VC (2010) Systemic Lupus Erythematosus: From Genes to Organ Damage. *Methods Mol Biol* 662:265-83.

Lalani TA, Kanne JP, Hatfield GA and Chen P (2004) Imaging findings in systemic lupus erythematosus. *Radiographics* 24(4):1069-86.

Lamkanfi M and Dixit V (2012) Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28:137-61.

Lamkanfi M and Dixit V (2014) Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157: 1013–22.

Lanna CCD, Ferreira GA e Telles RW (2014) Lupus Eritematoso Sistêmico. In: Carvalho MAP, Lanna CCD, Bértolo MB, Ferreira GA. 4. edição Reumatologia: Diagnóstico e Tratamento. Rio de Janeiro: AC Farmacêutica.

Lau E, Symmons D, Bankhead C, MacGregor A, Donnan S and Silman A (1993) Low prevalence of rheumatoid arthritis in the urbanized Chinese of Hong Kong. *J Rheumatol* 20:1133 – 7.

Laurindo IMM, Ximenes AC, Lima FAC, Pinheiro GRC, Batistella LR, Bertolo MB, Alencar P, Xavier RM, Giorgi RDN, Ciconelli RM e Radominski SC (2004) Artrite reumatóide: diagnóstico e tratamento. *Rev Bras Reumatol* 44(6): 435-42.

Lee HS, Irigoyen P, Kern M, Lee A, Batliwalla F, Khalili H, Wolfe F, Lum RF, Massarotti E and Weisman M *et al.* (2007) Interaction between smocking, the shared epitope and anticyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 56:1745–53.

Lee YH, Bae SC, Song GG (2015) FCGR2A, FCGR3A, FCGR3B polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Clin Exp Rheumatol* 33(5):647-54.

Leech M and Morand E (2013) Fibroblasts and synovial immunity. *Curr Opin Pharmacol* 13(4):565-9.

Lee-Kirsch MA, Gong M, Chowdhury D, Senenko L, Engel K, Lee YA, de Silva U, Bailey SL, Witte T and Vyse TJ *et al.* (2007) Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 are associated with systemic lupus erythematosus. *Nature Genet* 39(9):1065-7.

Leipe J, Grunke M, Dechant C, Reindl C, Kerzendorf U, Schulze-Koops H and Skapenko A (2010) Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum* 62(10):2876e2885.

Levandowski CB, Mailloux CM, Ferrara TM, Gowan K, Ben S, Jin Y, McFann KK, Holland PJ, Fain PR and Dinarello CA *et al.* (2013) NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1beta processing via the NLRP1 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*.110(8):2952–6

Li F, Guo N, Ma Y, Ning B, Wang Y and Kou L (2014) Inhibition of P2X4 suppresses joint inflammation and damage in collagen-induced arthritis. *Inflammation* 37:146–53.

Lieberman LA and Tsokos GC (2010) The IL-2 defect in systemic lupus erythematosus. disease has an expansive effect on host immunity. *J Biomed Biotechnol* 2010:740619.

Lipsky P (2008) Rheumatoid Arthritis. In: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DK, Hauser SL, Longo DL and Jameson JL *et al.* *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th Edition. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc.

Löfgren SE, Yin H, Delgado-Vega AM, Sanchez E, Lewén S, Pons-Estel BA, Witte T, D'Alfonso S, Ortego-Centeno N and Martin J *et al.* (2010) Promoter insertion/deletion in the IRF5 gene is highly associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in distinct populations, but exerts a modest effect on gene expression in peripheral blood mononuclear cells. *J Rheumatol* 37(3):574-8.

Louis PJ and Fernandes R (2001) Review of systemic lupus erythematosus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 91(5):512-6.

Louzada-Junior P, Souza BDB, Toledo RA e Ciconelli RM (2007) Análise descritiva das características demográficas e clínicas de pacientes com artrite reumatóide no estado de São Paulo, Brasil. *Rev Bras Reumatol* 47 (2):84-90.

Lundström E, Källberg H, Smolnikova M, Ding B, Rönnelid J, Alfredsson L, Klareskog L and Padyukov L (2009) Opposing effects of HLA-DRB1*13 alleles on the risk of developing anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 60(4):924-30.

Luterek-Puszyńska K, Malinowski D, Paradowska-Gorycka A, Safranow K and Pawlik A (2016) CD28, CTLA-4 and CCL5 gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*.

Mackay M, Stanevsky A, Wang T, Aranow C, Li M, Koenig S, Ravetch JV and Diamond B (2006) Selective dysregulation of the FcγRIIB receptor on memory B cells in SLE. *J Exp Med* 203(9):2157-64.

Magitta NF, Bøe Wolff AS, Johansson S, Skinningsrud B, Lie BA, Myhr KM, Undlien DE, Joner G, Njølstad PR and Kvien TK *et al.* (2009) A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. *Genes Immun*. 10:120–124.

Magnusson V, Johanneson B, Lima G, Odeberg J, Alarcón-Segovia D, Alarcón-Riquelme ME and SLE Genetics Collaboration Group (2004) Both risk alleles for FcγRIIA and FcγRIIIA are susceptibility factors for SLE: a unifying hypothesis. *Genes and Immunity* 5(2):130-7.

Manderson AP, Botto M and Walport MJ (2004) The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 22:431-56.

Marques Neto JF, Gonçalves E, Langen L, Cunha M, Radominski S, Oliveira S, Cury S, Medeiros F, Sampaio G (1993) Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide do adulto em amostras da população brasileira. *Rev Bras Reumatol* 33(5): 169-73.

Mathews RJ, Robinson JI, Battellino M, Wong C, Taylor JC; Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate (BRAGGSS), Eyre S, Churchman SM, Wilson AG and Isaacs JD *et al.* (2014) Evidence of NLRP3-inflammasome activation in rheumatoid arthritis (RA); genetic variants within the NLRP3-inflammasome complex in relation to susceptibility to RA and response to anti-TNF treatment. *Ann Rheum Dis* 73:1202–10.

McInnes and Georg Schett (2011) The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis *N Engl J Med* 365:2205-19.

Menke J, Bork T, Kutska B, Byrne KT, Blanfeld M, Relle M, Kelley VR and Schwarting A (2011) Targeting transcription factor Stat4 uncovers a role for interleukin-18 in the pathogenesis of severe lupus nephritis in mice. *Kidney international* 79(4):452–63

Messemaker TC, Huizinga TW and Kurreeman F (2015) Immunogenetics of rheumatoid arthritis: Understanding functional implications. *J Autoimmun* 64:74-81.

Millar K, Lloyd SM, McLean JS, Batty GD, Burns H, Cavanagh J, Deans KA, Ford I, McConnachie A and McGinty A (2013) Personality, socio-economic status and inflammation: cross-sectional, population-based study. *PLoS One*. 8: e58256.

Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, Nochy D, Debré P, Piette JC and Gorochoff G (2005) Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 175(12):8392-400.

Morris DL, Fernando MM, Taylor KE, Chung SA, Nititham J, Alarcón-Riquelme ME, Barcellos LF, Behrens TW, Cotsapas C and Gaffney PM *et al.*

(2014) MHC associations with clinical and autoantibody manifestations in European SLE. *Genes and immunity* 15:210–217.

Mota L, Cruz B, Brenol C, Pereira I, Rezende-Fronza L, Bertolo M, Freitas M, Silva N, Louzada-Júnior P e Giorgi R *et al.* (2012). Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. *Rev Bras Reumatol.* 52(2): 152-174.

Nakashima CA, Galhardo AP, Silva JF, Fiorenzano GR, Santos AB, Leite MF, Nogueira MA, Menolli PV and Menolli RA (2011) Incidence and clinical-laboratory aspects of systemic lupus erythematosus in a Southern Brazilian city. *Revista Brasileira de Reumatologia* 51(3):231-9.

Negi VS, Muralidharan N, Mehra S, Devaraju P, Mariaselvam CM, Gulati R, Salah S, Fortier C, Charron D and Krishnamoorthy R *et al.* (2014) IRF5rs2004640 single nucleotide polymorphism is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in South Indian Tamils. *Tissue Antigens* 84(5):465-70.

Nell-Duxneuner V, Machold K, Stamm T, Eberl G, Heinzl H, Hoefler E, Smolen JS and Steiner G (2010) Autoantibody profiling in patients with very early rheumatoid arthritis: a follow-up study. *Ann Rheum Dis.* 69: 169–74.

Neumann D, Tschernig T, Popa D, Schmiedl A, Perez de Lema G, Resch K and Martin UM (2006) Injection of IL-12- and IL-18-encoding plasmids ameliorates the autoimmune pathology of MRL/Mp-Tnfrsf6lpr mice: synergistic effect on autoimmune symptoms, *Int. Immunol* 18:1779-87.

Neven B, Prieur A and Quartier dit Maire P (2008) Cryopyrinopathies: update on pathogenesis and treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4: 481–89.

Niewold TB, Adler JE, Glenn SB, Lehman TJ, Harley JB and Crow MK (2008) Age- and sex-related patterns of serum interferon-alpha activity in lupus families. *Arthritis Rheum* 58(7):2113-9.

Niewold TB, Hua J, Lehman TJ, Harley JB and Crow MK (2007) High serum INF-alpha activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 8(6):492-502.

Niewold TB, Kelly JA, Flesch MH, Espinoza LR, Harley JB and Crow MK (2008) Association of the IRF5 risk haplotype with high serum interferon-alpha activity in systemic lupus erythematosus patients. *Arthritis and rheumatism* 2008 58:2481–2487.

Nossent J, Cikes N, Kiss E, Marchesoni A, Nasonova V, Mosca M, Olesinska M, Pokorny G, Rozman B and Schneider M *et al.* (2007) Current causes of death in systemic lupus erythematosus in Europe, 2000--2004: relation to disease activity and damage accrual. *Lupus* 16(5):309-17.

Ohl K and Tenbrock K (2011) Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2011:432595.

Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A and Yoshida S *et al.* (2014) Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature.* 506: 376–81.

Okamoto H, Iikuni N, Kamitsuji S, Yoshio T, Minota S and Kamatani N (2006) IP-10/MCP-1 ratio in CSF is an useful diagnostic marker of neuropsychiatric lupus patients. *Rheumatology* 45(2):232-4.

Okamoto H, Katsumata Y, Nishimura K and Kamatani N (2004) Interferon-inducible protein 10/CXCL10 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with central nervous system lupus. *Arthritis Rheumatism* 50(11):3731-2.

Oliver AM *et al.* (2008) Rheumatoid arthritis- treatment and assessment. In: Klippel JH, Stone JH, Crofford LJ, White PH, editors. Primer on the rheumatic disease. 13th edition. New York: Springer.

Onozaki K (2009) Etiological and biological aspects of cigarette smoking in rheumatoid arthritis. *Inflamm Allergy Drug Targets* 8:364–368.

Orozco G, Hinks A, Eyre S, Ke X, Gibbons LJ, Bowes J, Flynn E, Martin P; Wellcome Trust Case Control Consortium; YEAR consortium and Wilson AG *et al.* (2009) Combined effects of three independent SNPs greatly increase the risk estimate for RA at 6q23. *Hum Mol Genet* 18:2693–2699.

Ostendorf B, Iking-Konert C, Kurz K, Jung G, Sander O, Schneider M (2005) Preliminary results of safety and efficacy of the interleukin 1 receptor antagonist anakinra in patients with severe lupus arthritis. *Ann. Rheum Dis* 64:630–633.

Panoulas V, Smith J, Nightingale P and Kitas G (2009) Association of the TRAF1/C5 locus with increased mortality, particularly from malignancy or sepsis, in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 60:39-46.

Pascual V, Banchereau J and Palucka AK (2003) The central role of dendritic cells and interferon-alpha in SLE. *Curr Opin Rheumatol* 15(5):548-56.

Pathak S and Mohan C (2011) Cellular and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther* 13(5):24.

Peeva E and Zouali M (2005) Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B-lymphocytes. *Immunol Lett* 101: 123–143.

Perricone C, Ceccarelli F and Valesini G (2011) An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story. *Autoimmun Rev* 10(10):599-608.

Pinheiro G (2007) Instrumentos de Medida da Atividade da Artrite Reumatóide – Por que e como empregá-los. *Rev Bras Reumatol* 47 (5): 362-65

Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B, Liew A, Khalili H, Chandrasekaran A and Davies LR *et al* (2007) TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study. *N Engl J Med* 357(12):1199-209.

Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, Purcell S, Lee AT, Karlson EW, Wolfe F, Kastner DL, Alfredsson L and Altshuler D *et al.* (2005) Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am J Hum Genet* 77:1044–1060.

Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L and Cooper GS (2010). Understanding the Epidemiology and Progression of Systemic Lupus Erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 39(4):257-68.

Pontillo A, Brandao L, Guimaraes R, Segat L, Araujo J and Crovella S (2010) Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil. *Autoimmunity* 43(8):583-9.

Pontillo A, Girardelli M, Kamada AJ, Pancotto JA, Donadi EA, Crovella S and Sandrin-Garcia P (2012) Polimorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 45(4):271-8.

Pontillo A, Vendramin A, Catamo E, Fabris A and Crovella S (2011) The missense variation Q705K in CIAS1/NALP3/NLRP3 gene and an NLRP1 haplotype are associated with celiac disease. *Am J Gastroenterol* 106(3):539-44.

Power D, Codd M, Ivers L, Sant S and Barry M (1999) Prevalence of rheumatoid arthritis in Dublin, Ireland: a population based survey. *Ir J Med Sci* 168:197 – 200.

Prevoo M, van't Hof M, Kuper H, van Leeuwen M, van de Putte L and van Riel P (1995) Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 38:44–8.

Ramey D, Fries J and Singh G (1996) The Health Assessment Questionnaire. 1995 Status and Review. In B. Spilker *Quality of Life and Pharmacoeconomics in Clinical Trials*, 2nd edition. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers.

Ribeiro D, Araújo Neto C, D'Almeida F, Galvão VL e Santiago M (2011) Achados de imagem das alterações musculoesqueléticas associadas ao lupus eritematoso sistêmico. *Radiologia Brasileira* 44(1), 52-58.

Rieck M, Arechiga A, Onengut-Gumuscu S, Greenbaum C, Concannon P and Buckner JH (2007) Genetic variation in PTPN22 corresponds to altered function of T and B lymphocytes. *J. Immunol* 179(7):4704-10.

Riise T, Jacobsen BK and Gran J (2001). Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in the county of Troms, northern Norway. *J Rheumatol* 27:1386 – 9.

Roberts R, Topless R, Phipps-Green A, Gearry R, Barclay M and Merriman T (2010) Evidence of interaction of CARD8 rs2043211 with NALP3 rs35829419 in Crohn's disease. *Genes Immun* 11(4):351-6.

Robinson M, Cook SS and Currie LM (2011) Systemic lupus erythematosus: A genetic review for advanced practice nurses. *J Am Acad Nurse Pract* 23(12):629-3.

Rombouts Y, Ewing E, van de Stadt LA, Selman MH, Trouw LA, Deelder AM, Huizinga TW, Wuhler M, van Schaardenburg D and Toes RE (2015) Anti-citrullinated protein antibodies acquire a pro-inflammatory Fc glycosylation phenotype prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 74: 234–41.

Rönnblom L, Alm GV and Eloranta ML (2009). Type I interferon and lupus. *Current Opin Rheumatol* 21(5):471-7.

Rubtsov AV, Rubtsova K, Kappler JW and Marrack P (2010) Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity. *Autoimmun Rev* 9: 494–498

Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W and Khamashta MA (2010). Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 376(9751):1498-509.

Ruiz-Larriaga O, Uribarri M, Alcaro MC, Escorza-Treviño S, Del Amo J, Iriondo M, Manzano C, Migliorini P, Lóránd V and Estonba A (2016) Genetic variants associated with rheumatoid arthritis patients and serotypes in European populations. *Clin Exp Rheumatol* 34(2):236-41.

Saeed M (2017) Lupus pathobiology based on genomics. *Immunogenetics* 69(1):1-12.

Salama A, Elshazli R, Elsaid A and Settin A (2014) Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 (PTPN22) +1858 C>T gene polymorphism in Egyptian cases with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol* 290(1):62-5.

Sánchez E, Palomino-Morales RJ, Ortego-Centeno N, Jiménez-Alonso J, González-Gay MA, López-Nevot MA, Sánchez-Román J, de Ramón E, González-Escribano MF and Pons-Estel BA *et al.* (2009) Identification of a new putative functional IL18 gene variant through an association study in systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 18(19):3739-48.

Sasidharan PK, Bindya M and Sajeeth Kumar KG (2012) Hematological Manifestations of SLE at Initial Presentation: Is It Underestimated? *ISRN Hematol* 2012:961872.

Sato EI, Bonfá ED, Costallat LTL, Silva NA, Brenol JCT, Santiago MB, Szajubok JCM, Rachid-Filho A, Barros RT e Vasconcelos M (2006) Lupus eritematoso sistêmico: acometimento cutâneo/articular. *Rev Assoc Med Bras* 52(6): 375-388.

Scher JU, Littman DR and Abramson SB (2016) Microbiome in inflammatory arthritis and human rheumatic diseases. *Arthritis Rheumatol* 68 (1): 35–45.

Scher JU, Ubeda C, Artacho A, Attur M, Isaac S, Reddy SM, Marmon S, Neimann A, Brusca S and Patel T (2015) Decreased bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Arthritis Rheumatol* 67: 128–39.

Schoultz I, Verma D, Halfvarsson J, Törkvist L, Fredrikson M, Sjöqvist U, Lördal M, Tysk C, Lerm M and Söderkvist P *et al.* (2009) Combined polymorphisms in genes encoding the inflammasome components NALP3 and CARD8 confer susceptibility to Crohn's disease in Swedish men. *Am J Gastroenterol* 104(5):1180-8.

Schroder K and Tschopp J (2010) The inflammasomes. *Cell* 140(6):821-32.

Shaw P, McDermott M and Kanneganti T (2011). Inflammasomes and autoimmunity. *Trends Mol Med* 17(2):57–64.

Sigurdsson S, Göring HH, Kristjansdottir G, Milani L, Nordmark G, Sandling JK, Eloranta ML, Feng D, Sangster-Guity N and Gunnarsson I *et al.* (2008) Comprehensive evaluation of the genetic variants of interferon regulatory factor 5 (IRF5) reveals a novel 5 bp length polymorphism as strong risk factor for systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet* 17(6):872-81.

Silman AJ and Pearson JE (2002) Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 4 (suppl 3): S265–72.

Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A and Ollier WE. (1993) Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol.* 32: 903–07.

Simonsson M, Bergman S, Jacobsson L, Petersson I and Svensson B (1999). The prevalence of rheumatoid arthritis in Sweden. *Scand J Rheumatol* 28:340 – 3.

Siriboonrit U, Tsuchiya N, Sirikong M, Kyogoku C, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R and Fujiwara K *et al.* (2003) Association of Fcγ receptor IIb and IIIb polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens* 61(5):374-83.

Siu HO, Yang W, Lau CS, Chan TM, Wong RW, Wong WH, Lau YL and Alarcon-Riquelme ME (2008) Association of a haplotype of IRF5 gene with systemic lupus erythematosus in Chinese. *J Rheumatol* 35(2):360-2.

Smolen JS, Aletaha D and McInnes IB (2016). Rheumatoid arthritis. *Lancet.* 388(10055):2023-2038.

Soderlin M, Borjesson O, Kautiainen H, Skogh T and Leirisalo-Repo M (2002) Annual incidence of inflammatory joint diseases in a population based study in southern Sweden. *Ann Rheum Dis* 61:911 – 5.

Song GG, Bae SC and Lee YH (2016) Vitamin D receptor FokI, BsmI, and TaqI polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Z Rheumatol* 75(3):322-9.

Spindler A, Bellomio V, Berman A, Lucero E, Baigorria M, Paz S, Garrone N, Torres AI, Romano O and Carraccio A *et al.* (2002) Prevalence of rheumatoid arthritis in Tucuman, Argentina. *J Rheumatol* 29:1166 – 70.

Stetson DB, Ko JS, Heidmann T and Medzhitov R (2008) Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* 134(4):587-98.

Stoffer MA, Schoels MM, Smolen JS, Aletaha D, Breedveld FC, Burmester G, Bykerk V, Dougados M, Emery P and Haraoui B (2016) Evidence for treating rheumatoid arthritis to target: results of a systematic literature search update. *Ann Rheum Dis* 75: 16–22

Strowig T, Henao-Mejia J, Elinav E and Flavell R (2012) Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481: 278–86.

Sui J, Li H, Fang Y, Liu Y, Li M, Zhong B, Yang F, Zou Q and Wu Y (2012) NLRP1 gene polymorphism influences gene transcription and is a risk factor for rheumatoid arthritis in han chinese. *Arthritis Rheum* 64:647–54.

Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R and Ono M *et al* (2003) Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 34(4):395-402.

Suzuki T, Ikari K, Yano K, Inoue E, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H and Momohara S (2013) PADI4 and HLA-DRB1 are genetic risks for radiographic progression in RA patients, independent of ACPA status: results from the IORRA cohort study. *PLoS One* 8(4):e61045.

Symmons D, Barrett E, Bankhead C, Scott D and Silman A (1994) The incidence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: results of the Norfolk Arthritis Register. *Br J Rheumatol* 33:735 – 9.

Symmons D, Turner G, Webb R, Asten P, Barrett E, Lunt M, Scott D and Silman A (2002) The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. *Rheumatology* 41:793 – 800.

Taha Khalaf A, Song JQ, Gao TT, Yu XP and Lei TC (2011) CTLA-4 gene polymorphism and the risk of systemic lupus erythematosus in the Chinese population. *J Biomed Biotechnol* 2011:167395.

Takeuchi O and Akira S (2010) Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140: 805–20.

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N and Winchester RJ (1982) The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25(11):1271-7.

Teft WA, Kirchhof MG and Madrenas J (2006) A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol* 24:65-97.

Teixeira R, Gabriel Júnior A, De Martino MC, Martins LC, Lopes AC eTufik S (2007) Marcadores de Ativação Endotelial e Auto-Anticorpos na Artrite Reumatóide. *Rev Bras Reumatol* 47 (6): 411-17.

Trouw LA, Haisma EM, Levarht EW, van der Woude D, Ioan-Facsinay A, Daha MR, Huizinga TW and Toes RE (2009) Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways. *Arthritis Rheum.* 60, 1923–31.

Ulker M, Yazisiz V, Sallakci N, Avci AB, Sanlioglu S, Yegin O and Terzioglu E (2009) CTLA-4 gene polymorphism of exon 1(+49 A/G) in Turkish systemic lupus erythematosus patients. *Int J Immunogenet* 36(4):245-50.

Umare V, Pradhan V, Nadkar M, Rajadhyaksha A, Patwardhan M, Ghosh KK and Nadkarni AH (2014) Effect of proinflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , and

IL-1 β) on clinical manifestations in Indian SLE patients. *Mediators Inflamm* 2014:385297. t

Uva L, Miguel D, Pinheiro C, Freitas JP, Marques Gomes M and Filipe P (2012) Cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. *Autoimmune Dis* 2012:834291.

Valencia X, Yarboro C, Illei G and Lipsky PE (2007) Deficient CD4+CD25^{high} T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 178(4):2579-88.

van der Helm-van Mil A, Huizinga T, de Vries R and Toes R (2007) Emerging patterns of risk factor make-up enable subclassification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56(6):1728-35.

Van Gestel A, Haagsma C and van Riel P (1998). Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joint counts. *Arthritis Rheum* 41:1845–50.

Vanaja S, Rathinam V and Fitzgerald K (2015) Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol* 25: 308–15.

Vande Walle L, Van Opdenbosch N, Jacques P, Fossoul A, Verheugen E, Vogel P, Beyaert R, Elewaut D, Kanneganti TD and van Loo *Get al* (2014) Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis. *Nature* 512:69–73.

Vargas KS e Romano MA (2009) Lupus Eritematoso Sistêmico: aspectos epidemiológicos e diagnóstico. *Revista Salus-Guarapuava* 1(3):15-22.

Viatte S, Plant D, Han B, Fu B, Yarwood A, Thomson W, Symmons DP, Worthington J, Young A and Hyrich KL *et al* (2015) Association of HLA-DRB1 haplotypes with rheumatoid arthritis severity, mortality, and treatment response. *JAMA* 313: 1645–56.

Viatte S, Plant D and Raychaudhuri S (2013) Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 9(3):141-53.

Vilar M e Sato E (2002) Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). *Lupus* 11(8):528-532.

Volin MV and Koch AE (2011) Interleukin-18: a mediator of inflammation and angiogenesis in rheumatoid arthritis, *J. Interferon Cytokine Res* 31(10):745e751

Wang B, Zhu JM, Fan YG, Feng CC, Chen GM, Chen H, Pan HF and Ye DQ (2013) The association of IL1 α and IL1 β polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Gene* 527(1):95–101.

Wen D, Liu J, Du X, Dong JZ and Ma CS (2014) Association of interleukin-18 (–137G/C) polymorphism with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *International reviews of immunology* 33(1):34–44.

Wen H, Miao E and Ting J (2013) Mechanisms of NOD-like receptor-associated inflammasome activation. *Immunity* 39: 432–41.

Weyand C and Goronzy J (1992) Homozygosity for the HLA-DRB1 allele selects for extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 89(6):2033-9.

Willcocks LC, Lyons PA, Clatworthy MR, Robinson JI, Yang W, Newland SA, Plagnol V, McGovern NN, Condliffe AM and Chilvers ER *et al.* (2008) Copy number of FCGR3B, which is associated with systemic lupus erythematosus,

correlates with protein expression and immune complex uptake. *J Exp Med* 205(7):1573-82.

Wolfe F, Mitchell D, Sibley J, Fries J, Bloch D, Williams C, Spitz P, Haga M, Kleinheksel S and Cathey M (1994) The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 37:481 – 94.

Wong CK, Wong PT, Tam LS, Li EK, Chen DP and Lam CW (2009) Activation profile of intracellular mitogen-activated protein kinases in peripheral lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Clinical Immunology* 29(6):738-46.

Wong CK, Wong PT, Tam LS, Li EK, Chen DP and Lam CW (2010) Elevated production of B Cell Chemokine CXCL13 is correlated with systemic lupus erythematosus disease activity. *Journal of Clinical Immunology* 30(1):45-52.

Yang CA, Huang ST and Chiang BL (2015) Sex-dependent differential activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in SLE macrophages. *Rheumatology* 54(2):324-31.

Yang W, Shen N, Ye DQ, Liu Q, Zhang Y, Qian XX, Hirankarn N, Ying D, Pan HF and Mok CC *et al.* (2010) Genome-wide association study in Asian populations identifies variants in ET, S1 and WDFY4 associated with systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet* 6(2):e1000841.

Yao Y, Wang JB, Xin MM, Li H, Liu B, Wang LL, Wang LQ and Zhao L (2016) Balance between inflammatory and regulatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *Genet Mol Res* 15(2).

Yu SL, Kuan WP, Wong CK, Li EK and Tam LS (2012). Immunopathological Roles of cytokines, Chemokines, SignalingMolecules, and Pattern-Recognition Receptors in Systemic Lupus Erythematosus. *Clin Dev Immunol* 2012:715190.

Yurasov S, Tiller T, Tsuiji M, Velinzon K, Pascual V, Wardemann H and Nussenzweig MC (2006) Persistent expression of autoantibodies in SLE patients in remission. *J Exp Med* 203(10):2255-61.

Yurasov S, Wardemann H, Hammersen J, Tsuiji M, Meffre E, Pascual V and Nussenzweig MC (2005) Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 201(5):703-11.

Zambetti L, Laudisi F, Licandro G, Ricciardi Castagnoli P and Mortellaro A (2012) The rhapsody of NLRPs: master players of inflammation...and a lot more. *Immunol Res* 53:78-90.

Zandman-Goddard G, Berkun Y, Barzilai O, Boaz M, Blank M, Ram M, Sherer Y, Anaya JM and Shoenfeld Y (2009) Exposure to Epstein–Barr virus infection is associated with mild systemic lupus erythematosus disease. *Ann N Y Acad Sci* 1173: 658–663.

Zandman-Goddard G, Solomon M, Rosman Z, Peeva E and Shoenfeld Y (2012) Environment and lupus-related diseases. *Lupus*. 21(3):241-50.

ANEXOS

NORMAS DO PERIÓDICO JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE

Manuscript lengths and formats

The main text body of an Original Article should not exceed 3500 words and 60 references. The number of display items may not exceed 8 figures including tables.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Important note on Manuscript Title

The manuscript title should be clear, concise and capture the conceptual significance for a broad audience. It should not exceed 12 words and include sufficient detail for indexing purposes but be general enough for readers outside the field to appreciate what the paper is about. The use of jargon, uncommon abbreviations, acronyms, or punctuation should be avoided. For publication, titles may be revised by the Editorial Board to ensure clarity and accessibility to our wide readership, with the final approval of the authors.

Important note on Abstract

The abstract may not exceed 250 words and should provide a clear synopsis of the reported findings that is accessible to a non specialist reader. It should state the rationale, objectives, findings, and conclusions of the manuscript. References and primary data should not be presented in abstracts, and nonstandard abbreviations must be defined. For publication, abstracts may be revised by the Editorial Board to ensure clarity and accessibility to our wide readership, with the final approval of the authors.

Key Messages

Key messages are mandatory for original articles in this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'key messages' in the file name and include 3 to 5 bullet points that describe the essence of the research (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments and Funding Information

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full. In addition, please provide the funding information in a separate step of the submission process in the peer review system. Funder names should preferably be selected from the standardized list you will see during submission. If the funding institution you need is not listed, it can be entered as free text. Funding information will be published as searchable metadata for the accepted article, whereas acknowledgements are published within the paper.

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets.

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “*et al*” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L *et al* (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London
Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

NORMAS DO PERIÓDICO EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS

Title Page: The title page should bear the title of the paper, a running title, the full names of all the authors and their affiliations, together with the name, full postal address, telephone and fax numbers and e-mail address of the author to whom correspondence and offprint requests are to be sent (this information is also asked for on the electronic submission form). The title page must also contain a Conflict of Interest statement (see Editorial Policy section).

The title should be brief, informative, of 145 characters or less (total includes spaces) or less and should not make a statement or conclusion.

The running title must not exceed a maximum of 50 characters or less (total includes spaces). It should be as brief as possible, convey the essential message of the paper and contain no abbreviations.

Authors should disclose the sources of any support for the work, received in the form of grants and/or equipment and drugs.

Abstract: Articles, Reviews and Short Reports must be prepared with an unstructured abstract designed to summarise the essential features of the paper in a logical and concise sequence.

3-6 Keywords should also be included on this page.

Materials/Subjects and Methods: This section should contain sufficient detail, so that all experimental procedures can be reproduced, and include references. Methods, however, that have been published in detail elsewhere should not be described in detail. Authors should provide the name of the manufacturer and their location for any specifically named medical equipment and instruments, and all drugs should be identified by their pharmaceutical names, and by their trade name if relevant.

Results and Discussion: The Results section should briefly present the experimental data in text, tables or figures. Tables and figures should not be described extensively in the text, either. The discussion should focus on the interpretation and the significance of the findings with concise objective comments that describe their relation to other work in the area. It should not repeat information in the results. The final paragraph should highlight the main conclusion(s), and provide some indication of the direction future research should take.

Acknowledgements: These should be brief, and should include sources of support including sponsorship (e.g. university, charity, commercial organisation) and sources of material (e.g. novel drugs) not available commercially.

Conflict of Interest: Authors must declare whether or not there are any competing financial interests in relation to the work described. This information must be included at this stage and will be published as part of the paper. Conflict of interest should be noted in the cover letter and also on the title page. Please see the Conflict of Interest documentation in the Editorial Policy section for detailed information.

References: Only papers directly related to the article should be cited. Exhaustive lists should be avoided. Within the text the references should appear as numbers starting at one and at the end of the paper they should be listed (double-spaced) in numerical order corresponding to the order of citation in the text. Where a reference is to appear next to a number in the text, for example following an equation, chemical formula or biological acronym, citations should be written as (ref. X) and not as superscript. Example “detectable levels of endogenous Bcl-2 (ref. 3), as confirmed by western blot”

All authors should be listed for papers with up to six authors; for papers with seven or more authors, the first three authors only should be listed, followed by et al.

Abbreviations for titles of medical periodicals should conform to those used in the latest edition of Index Medicus. The first and last page numbers for each reference should be provided. Abstracts and letters must be identified as such. Papers in press may be included in the list of references. Personal communications must be allocated a number and included in the list of references in the usual way or simply referred to in the text; the authors may choose which method to use. In either case authors must obtain permission from the individual concerned to quote his/her unpublished work.

Examples:

Journal article, up to six authors:

Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005; 6: 353–360.

Journal article, 7 or more authors:

Belkaid Y, Rouse BT, Smith A, et al. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005; 6: 353–360.

Journal article, e-pub ahead of print:

Bonin M, Pursche S, Bergeman T, et al. F-ara-A pharmacokinetics during reduced-intensity conditioning therapy with fludarabine and busulfan. *Bone Marrow Transplant* 2007; e-pub ahead of print 8 January 2007; doi:10.1038/sj.bmt.1705565

Journal article, in press: Gallardo RL, Juneja HS, Gardner FH. Normal human marrow stromal cells induce clonal growth of human malignant T lymphoblasts. *Int J Cell Cloning* (in press).

Complete book: Atkinson K, Champlin R, Ritz J, Fibbe W, Ljungman P, Brenner MK (eds). *Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation*, 3rd edn. Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2004.

Chapter in book: Coccia PF. Hematopoietic cell transplantation for osteopetrosis. In: Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR (eds). *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*, 3rd edn. Blackwell Publishing Ltd: Malden, MA, USA, 2004, pp 1443–1454.

Abstract: Syrjala KL, Abrams JR, Storer B, Heiman JR. Prospective risk factors for five-year sexuality late effects in men and women after haematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37(Suppl 1): S4 (abstract 107).

Figure Legends: These should be brief, specific and appear on a separate manuscript page after the References section and entitled ‘Titles and legends to figures’.

Tables: Tables should only be used to present essential data; they should not duplicate the context of the text. It is imperative that any tables used are editable, ideally presented in Excel. Each must be uploaded as a separate workbook with a title or caption and be clearly labelled, sequentially. Reference to table footnotes should be made by means of Arabic numerals. They should consist of at least two columns; columns should always have headings. Please make sure each table is cited within the text and in the correct order, e.g. (Table 3). Please save the files with extensions .xls / .xlsx / .ods / or .doc or .docx. Please ensure that you provide a 'flat' file, with single values in each cell with no macros or links to other workbooks or worksheets and no calculations or functions.

Figures: Figures and images should be labelled sequentially and cited in the text. Figures should not be embedded within the text but rather uploaded as separate files. Detailed guidelines for submitting artwork can be found by downloading our Artwork Guidelines. The use of three-dimensional histograms is strongly discouraged when the addition of the third dimension gives no extra information.

OUTRAS PRODUÇÕES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO

Co-autora do artigo “Diabetes mellitus no Brasil: características clínicas, padrão de tratamento e custos associados ao cuidado da doença” publicado no Jornal Brasileiro de Economia da Saúde. 2016, v8, n2, p80-90.

ARTIGO ORIGINAL
ORIGINAL ARTICLE

Diabetes mellitus no Brasil: características clínicas, padrão de tratamento e custos associados ao cuidado da doença

Diabetes Mellitus in Brazil: clinical characteristics, standard treatment choice and cost

José Francisco Kerr Saraiva¹, Miguel Nasser Hissa², João Soares Felício³, Catarina Addobbati Jordão Cavalcanti⁴, Gabriela Luporini Saraiva⁴, Tony Pitha⁴, Antônio Roberto Chacra⁵

J Bras Econ Saúde 2016;8(2): 80-90

DOI: 10.21115/JBES.v8.n2.p80-90

Co-autora do artigo “Association of interferon-induced helicase C domain (IFIH1) gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus and a relevant updated meta-analysis” publicado na Genetics and Molecular Research Journal. 2016 Oct 24;15(4).



Association of interferon-induced helicase C domain (IFIH1) gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus and a relevant updated meta-analysis

J. De Azevedo Silva^{1,2}, S.C. Lima¹, C. Addobbati^{1,2}, R. Moura^{1,2}, L.A. Cavalcanti Brandão^{1,2,3}, J.A. Três Pancoto⁴, E.A. Donadi⁵, S. Crovella^{1,2} and P. Sandrin-Garcia^{1,2}

Co-autora do artigo “A genetic variant within *SLC30A6* has a protective role in the severity of rheumatoid arthritis” publicado na Scand J Rheumatol. 2016 Oct 19:1-2.



Autora (autoria compartilhada) do artigo “Vitamin D receptor polymorphisms and expression profile in rheumatoid arthritis Brazilian patients” publicado na Molecular Biology Reports Journal. 2016 Jan;43(1):41-51.



Autora do artigo “Ficolins genes polymorphisms in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis”, publicado na *Annals of human genetics* journal. 2016 Jan;80(1):1-6.

Ficolin Gene Polymorphisms in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis

Catarina Addobbati^{1,2*}, Jaqueline de Azevêdo Silva², Nathália A. C. Tavares², Odirlei Monticielelo³, Ricardo M. Xavier³, João Carlos T. Brenol³, Sergio Crovella^{1,2}, José Artur B. Chies⁴ and Paula Sandrin-Garcia^{1,2}

¹Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

²Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

³Division of Rheumatology, Clinical Hospital, and Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

⁴Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Autora (autoria compartilhada) do artigo “Comprehensive analysis of polymorphisms in the *HLA-G* 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus” publicado na *Tissue Antigens* Journal. 2015 Jun; 85(6):458-65.

Comprehensive analysis of polymorphisms in the *HLA-G* 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus

E. Catamo^{1†}, C. Addobbati^{2†}, L. Segat³, T. Sotero Fragoso², A. Tavares Dantas⁴, H. de Ataíde Mariz⁴, L. Ferreira da Rocha Junior⁴, A. L. Branco PintoDuarte², A. V. C. Coelho², R. R. de Moura², V. Polesello³, S. Crovella^{3,5} & P. Sandrin Garcia²

Autora do artigo “*FYB* polymorphisms in Brazilian patients with type I diabetes mellitus and autoimmune polyglandular syndrome type III” publicado na Genetics and Molecular Research Journal. 2015 Jan 15; 14(1):29-33.



Short Communication

***FYB* polymorphisms in Brazilian patients with type I diabetes mellitus and autoimmune polyglandular syndrome type III**

C.J.C. Addobbati^{1,2}, J. de Azevêdo Silva², N.A.C. Tavares², J. Araújo³,
R.L. Guimarães^{1,2}, L. Brandão^{1,4}, S. Crovella^{1,2} and P. Sandrin-Garcia^{1,2}

Co-autora do artigo “A rapid screening of ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco, Brazil” publicado na Genetics and Molecular Research Journal. 2015; 14 (1): 2876 – 2884.



A rapid screening of ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco, Brazil

A.V.C. Coelho^{1,2}, R.R. Moura^{1,2}, C.A.J. Cavalcanti^{1,2}, R.L. Guimarães^{1,2},
P. Sandrin-Garcia^{1,2}, S. Crovella³ and L.A.C. Brandão^{2,4}

Co-autora do artigo “*HLA-G* gene polymorphisms associated with susceptibility to rheumatoid arthritis disease and its severity in Brazilian patients” publicado na *Tissue Antigens Journal*. 2014 Sep;84(3):308-15.



BRIEF COMMUNICATION

HLA-G gene polymorphisms associated with susceptibility to rheumatoid arthritis disease and its severity in Brazilian patients

E. Catamo¹, C. Addobbati^{2,3}, L. Segat⁴, T. Sotero Fragoso^{3,5}, A. Domingues Barbosa^{3,5}, A. Tavares Dantas⁵, H. de Ataíde Mariz⁵, L. F. da Rocha Jr⁵, A. L. Branco Pinto Duarte⁵, L. Monasta⁴, P. Sandrin-Garcia^{2,3} & S. Crovella^{1,4}

Autora (autoria compartilhada) do artigo de revisão “Systemic Lupus Erythematosus: Old and New Susceptibility Genes *versus* Clinical Manifestations” publicado na *Current Genomics Journal*. 2014 Feb; 15(1):52-65.

Systemic Lupus Erythematosus: Old and New Susceptibility Genes *versus* Clinical Manifestations

J. De Azevêdo Silva^{1*}, C. Addobbati^{1,2}, P. Sandrin-Garcia^{1,2} and S. Crovella^{1,2}

¹Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil;

²Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

CURRICULO LATTES

Formação acadêmica/titulação

2013

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Genética.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Título: Polimorfismos e expressão dos genes do inflamassoma: associação com a susceptibilidade à artrite reumatoide

Orientador: Paula Sandrin-Garcia

Co-orientador: Sergio Crovella

2011 - 2013

Mestrado em Biologia Aplicada à Saúde.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Título: Polimorfismos do gene FYB (Proteína Ligante de FYN): associação com o Lúpus Eritematoso Sistêmico, Ano de obtenção: 2013

Orientador: Sergio Crovella

Co-orientador: Paula Sandrin-Garcia

2011 - 2012

Especialização em Patologia Clínica.

Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil

Título: Estudo de associação do polimorfismo indel de 14pb no gene HLA-G com a susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico

Orientador: Paula Sandrin-Garcia

2007 - 2010

Graduação em Biomedicina.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Título: Associação de Polimorfismos de Base Única (SNPs) do gene FYB (FYN BINDING PROTEIN) com a susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico

Orientador: Dra. Paula Sandrin Garcia

Atuação Profissional

2015 - Atual

Astrazeneca do Brasil

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Medical Science Liaison na área terapêutica de Diabetes.

Formação complementar

2014 - 2014

Doutorado sanduíche.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

2013 - 2013

Extensão universitária em PCR em Tempo Real: Princípios Básicos e Aplicações.
(Carga horária: 60h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Prêmios e títulos**2014**

Menção Honrosa ao trabalho "CARD8 rs2043211 (p.C10X) polymorphism is associated with a higher functional disability in Rheumatoid Arthritis Brazilian patients", Sociedade Brasileira de Genética

Produção bibliográfica**Artigos completos publicados em periódicos**

1. SILVA, J. E. A.; Addobbati, CJC; PONTILLO, A et al.
A genetic variant within SLC30A6 has a protective role in the severity of rheumatoid arthritis.
Scandinavian Journal of Rheumatology.
Fator de Impacto(2015 JCR): 2,3070, v.1, p.1 - 2, 2016.
2. DE AZEVEDO SILVA, J.; LIMA, S.C.; ADDOBBATI, C. et al.
Association of interferon-induced helicase C domain (IFIH1) gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus and a relevant updated meta-analysis.
Genetics and Molecular Research.
Fator de Impacto(2015 JCR): 0,7640, v.15, p.10 - , 2016.
3. SARAIVA, JOSÉ; HISSA, MIGUEL; FELÍCIO, JOÃO et al.
Diabetes mellitus no Brasil: características clínicas, padrão de tratamento e custos associados ao cuidado da doença.
Jornal Brasileiro de Economia da Saúde. v.8, p.80 - 90, 2016.
4. ADDOBBATI, CATARINA; DE AZEVÊDO SILVA, JAQUELINE et al.
Ficolin Gene Polymorphisms in Systemic Lupus Erythematosus and Rheumatoid Arthritis. Annals of Human Genetics (Print).
Fator de Impacto(2015 JCR): 1,8890, v.80, p.1 - 6, 2016.
5. CAVALCANTI, CATARINA ADDOBBATI JORDÃO; DE AZEVÊDO SILVA, JAQUELINE et al.
Vitamin D receptor polymorphisms and expression profile in rheumatoid arthritis brazilian patients.
Molecular Biology Reports.
Fator de Impacto(2015 JCR): 1,6980, v.43, p.41 - 51, 2016.
6. COELHO, A.V.C.; MOURA, R.R.; CAVALCANTI, C.A.J. et al.
A rapid screening of ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco, Brazil.
Genetics and Molecular Research.

Fator de Impacto(2015 JCR): 0,7640, v.14, p.2876 - 2884, 2015.

7. CATAMO, E.; ADDOBBATI, C. et al.

Comprehensive analysis of polymorphisms in the HLA-G 5'- upstream regulatory and 3'- untranslated regions in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus.

Tissue Antigens.

Fator de Impacto(2015 JCR): 2,0460, v.85, p.458 - 465, 2015.

8. ADDOBBATI, C.J.C.; DE AZEVEDO SILVA, J. et al.

Short Communication FYB polymorphisms in Brazilian patients with type I diabetes mellitus and autoimmune polyglandular syndrome type III.

Genetics and Molecular Research.

Fator de Impacto(2015 JCR): 0,7640, v.14, p.29 - 33, 2015.

9. CATAMO, E.; ADDOBBATI, C. et al.

HLA-G gene polymorphisms associated with susceptibility to rheumatoid arthritis disease and its severity in Brazilian patients.

Tissue Antigens.

Fator de Impacto(2015 JCR): 2,0460, v.84, p.n/a - n/a, 2014.

10. DE AZEVEDO SILVA, J.; ADDOBBATI, C. et al.

Systemic Lupus Erythematosus: Old and New Susceptibility Genes versus Clinical Manifestations.

Current Genomics.

Fator de Impacto(2015 JCR): 2,4300, v.15, p.52 - 65, 2014.

11. ADDOBBATI, CATARINA; BRANDÃO, LUCAS ANDRÉ CAVALCANTI et al.

FYB gene polymorphisms are associated with susceptibility for Systemic Lupus Erythematosus (SLE).

Human Immunology.

Fator de Impacto(2015 JCR): 2,1270, v.74, p.1009 - 1014, 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. ADELINO, E.; ADDOBBATI, C. et al.

CARD8 rs2043211 (p.C10X) POLYMORPHISM IS ASSOCIATED WITH A HIGHER FUNCTIONAL DISABILITY IN RHEUMATOID ARTHRITIS BRAZILIAN PATIENTS In: 60º Congresso Brasileiro de Genética, 2014, Guarujá, SP.

2. ADDOBBATI, CATARINA; Jaqueline de Azevedo Silva et al.

ASSOCIATION OF HLA-G GENE POLYMORPHISM (3003 T>C) WITH RISK FOR SLE In: 11th World Congress on Inflammation, 2013, Natal.

3. ADELINO, E.; ADDOBBATI, C. et al.

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs2248098 [C>T] DO GENE VDR COM A SUSCEPTIBILIDADE À ARTRITE REUMATOIDE In: Jornada de Pós-graduação em Genética, 2013, Recife, PE.

4. ADDOBBATI, C.; SOTERO FRAGOSO, T. et al.
ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O GENE FVB E A ARTRITE REUMATOIDE
In: Jornada de Pós-graduação em Genética, 2013, Recife, PE.
5. Paula Sandrin-Garcia; Addobbati, CJC et al.
INFLAMMASOME-RELATED PROTEIN NALP1 POLYMORPHISMS AND
RHEUMATOID ARTHRITIS SUSCEPTIBILITY IN NORTHEAST BRAZILIAN
PATIENTS In: 11th World Congress on Inflammation, 2013, Natal.
6. ADDOBBATI, CATARINA; Jaqueline de Azevedo Silva et al.
VDR gene polymorphisms and Rheumatoid Arthritis In: Encontro de Imunologia
Norte-Nordeste, 2013, Natal.
7. Jaqueline de Azevedo Silva; Alexandre Domingues Barbosa; Amanda
Luiza Melo Tavares Ramos et al.
VITAMIN D RECEPTOR POLYMORPHISMS AND VITAMIN D LEVELS:
SUSCEPTIBILITY TO OSTEOPOROSIS IN NORTHEAST BRAZILIAN
PATIENTS? In: 11th World Congress on Inflammation, 2013, Natal.

Apresentação de trabalho e palestra

1. Addobbati, CJC. Novos genes candidatos ao desenvolvimento do
Lúpus Eritematoso Sistêmico, 2014. (Conferência ou palestra, Apresentação de
Trabalho)
2. Addobbati, CJC. Aspectos moleculares do Lúpus Eritematoso
Sistêmico, 2013. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)

Orientações e supervisões

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Eduardo Adelino. CARD8 rs2043211 (p.C10X) polymorphism is associated with
a higher functional disability in rheumatoid arthritis brazilian patients. 2014.
Curso Biomedicina - Universidade Federal de Pernambuco

Eventos

Participação em eventos

1. 52rd Annual Meeting of the European Association For Study of
Diabetes, 2016. (Congresso)
2. Apresentação de Poster / Painel no 11th World Congress on
Inflammation, 2013. (Congresso) Association of HLA-G gene polymorphism (3003
T>C) with risk for SLE.
3. Apresentação de Poster / Painel no Encontro de Imunologia Norte-
Nordeste, 2013. (Congresso) Association of VDR gene with Arthritis Rheumatoid.