

**Instituto Politécnico de Coimbra**



**Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra**

**Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública**



**Instituto Politécnico  
de Coimbra**

# **Expressão génica de genes associados à morte celular por apoptose em LES**

**Andreia Sofia da Fontoura Areias**

**Coimbra**

**2013**

**Instituto Politécnico de Coimbra**



**Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra**

**Departamento de Análises Clínicas e Saúde Pública**



**Instituto Politécnico  
de Coimbra**

## **Expressão génica de genes associados à morte celular por apoptose em LES**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Augusto Paiva, Professor adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra e co-orientação do Dr. António José Martinho Gomes Teixeira, Assessor Superior da Carreira de Técnico Superior de Saúde do IPST.

## **Agradecimentos**

Agradeço ao Centro do Sangue e da Transplantação de Coimbra | Instituto Português do Sangue e da Transplantação na pessoa do Doutor Artur Paiva pelo conhecimento transmitido e pela enorme paciência e vontade de me ajudar ao longo da realização deste trabalho.

Agradeço ao Dr António Martinho pela serenidade e apoio mostrado na realização deste trabalho.

Agradeço ao Serviço de Reumatologia, à Dr<sup>a</sup>. Mariana Santiago, Dr<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> João e ao Professor Doutor José António Pereira da Silva.

Agradeço à Ana Gonçalves toda a dedicação, preocupação amizade e alento que me deu na realização deste trabalho, foi uma verdadeira amiga.

Agradeço aos meus pais por me acompanharem em cada nova jornada da minha vida, são a minha força, cada ensinamento que me deram fazem de mim a pessoa que sou e nunca hei-de conseguir ser tão forte e verdadeira como eles são. Obrigada avó pelo encorajamento em nunca desistir pois é pra ti que vão todas as minhas agonias.

Agradeço ao João por cada palavra de consolo, amor e por aturar todo o mau feitio quando as coisas não correm como eu queria. Obrigada a Dona Letícia e Sr. João por me darem sempre um sorriso mesmo quando eu só tinha má disposição.

Agradeço à melhor amiga do mundo, Magda, por nunca me faltares e te dedicares tanto a mim. O meu muito obrigado Sílvia Pinto por todas as horas passadas a ajudar-me, sempre com uma teimosia maior que a minha a dizer que eu ia conseguir, nada disto ficará esquecido.

Agradeço ao Vasco pela ajuda preciosa que me deu.

**Júri**

Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública Ana Maria de Figueiredo Valado

Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Doutor Martin Perez-Andrés

Professor Assistente da Universidade de Salamanca

Doutor Artur Augusto Paiva

Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Dr. António José Martinho Gomes Teixeira

Assessor Superior da Carreira Técnica Superior de Saúde do IPST

## Resumo

**Introdução:** O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença auto-imune crónica sistémica com múltiplas alterações imunológicas e que apresenta uma grande diversidade de manifestações clínicas. É caracterizada pela produção de auto-anticorpos e pela infiltração de células inflamatórias nos tecidos alvo.

Os neutrófilos são células fagocíticas com um tempo de semi-vida curto, sendo das primeiras células a serem recrutadas do sangue periférico para o local de inflamação, contribuindo desta forma para o processo inflamatório.

Embora a etiopatogenia do LES não esteja completamente compreendida, considera-se que as anormalidades do processo apoptótico possam estar envolvidas no desenvolvimento da doença. Apoptose é também essencial para o estabelecimento de tolerância imune.

Neste sentido fomos quantificar a expressão genética de Fas-L, Bcl-2, TNF $\alpha$  e TNFR1 em neutrófilos do sangue periférico purificados de doentes com LES activo, inactivo e de um grupo controlo, correlacionando estes dados com parâmetros de atividade da doença.

O grupo de doentes com LES era constituído por 45 mulheres e 4 homens com uma média de idades de 35,3 $\pm$ 11,5 e 23,5 $\pm$ 4,2 anos, respetivamente, o grupo controlo era constituído por 30 indivíduos saudáveis com uma média de idades de 30 $\pm$ 6 anos.

**Métodos:** Analisou-se a expressão do RNAm da Bcl-2, Fas-L, TNFR1 e TNF $\alpha$  em neutrófilos do sangue periférico, separados por *cell sorting*. A quantificação da expressão de mRNA foi efectuada através de PCR em tempo real.

**Resultados:** Verificou-se um aumento da expressão genética de TNFR1 em doentes com a doença activa e de uma maneira geral, em LES, uma diminuição da expressão de Bcl-2, de TNF $\alpha$  e de Fas-L.

**Conclusão:** Os resultados sugerem a presença de alterações na expressão genética de genes associados à morte celular por apoptose, em neutrófilos do sangue periférico de doentes com LES, o que pode contribuir para a neutropenia que ocorre nesta doença.

## Palavras-chave

Lúpus Eritematoso Sistémico, Neutrófilos, Fas-L, Bcl-2, TNF $\alpha$ , TNFR1

## Abstract

**Introduction:** The Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic systemic auto-immune disease with multiple immunologic abnormalities that presents a variety of clinical manifestations. It is characterized by the production of auto-antibodies and the infiltration of inflammatory cells on target tissues.

The neutrophils are phagocytes with short half-life, being the first to be recruited from the peripheral blood to the inflammation site, and therefore contributing to the inflammatory process.

Even though the etiopathogeny of SLE is not fully understood, it is considered that abnormalities in the apoptosis process might be involved in the disease development. Apoptosis is also essential to the establishment of immune tolerance.

Therefore our purpose was to quantify the genetic expression of Fas-L, Bcl-2, TNF $\alpha$  and TNFR1 in purified peripheral blood neutrophils from active SLE patients, inactive SLE patients, and from a control group, correlating the obtained results with activity parameters of the disease.

The SLE patients group was composed by 45 women and 4 men with an average age of  $35,3\pm 11,5$  e  $23,5\pm 4,2$  years, and a control group formed by 30 healthy individuals with an average age of  $30\pm 6$  years.

**Methods:** We analyzed the mRNA expression of Bcl-2, Fas-L, TNFR1 and TNF $\alpha$  in peripheral blood purified neutrophils by real time PCR.

**Results:** Our results suggest that patients with active SLE express higher amounts of TNFR1, and in general, we observed, in SLE patients, lower mRNA levels of Bcl-2, TNF $\alpha$  and Fas-L.

**Conclusion:** Based in our results, we suggest that some modifications occurred in the mRNA expression of genes associated with apoptosis cell death in peripheral blood neutrophils from SLE patients, that can contribute, at least in part, to the neutropenia observed in the disease.

## Keywords

Systemic Lupus Erythematosus, Neutrophils, Fas-L, Bcl-2, TNF $\alpha$ , TNFR1

# Índice

1. Introdução .....	1
1.1. Bases da Autoimunidade .....	1
1.2. Fisiopatologia do Lupus Eritematoso Sistémico .....	2
1.3. Neutrófilos na patogénese do Lupus Eritematoso Sistémico .....	4
1.4. Apoptose no Lupus Eritematoso Sistémico .....	7
1.5. Fas-L no Lupus Eritematoso Sistémico .....	9
1.6. BCL-2 no Lupus Eritematoso Sistémico .....	10
1.7. TNF- $\alpha$ no Lupus Eritematoso Sistémico .....	11
2. Objetivos .....	12
3. Material e Métodos .....	13
3.1. Grupos de estudo .....	13
3.2. Amostras .....	13
3.3. Ética .....	14
3.4. Análise da Expressão Génica .....	14
3.5. Análise Estatística .....	15
4. Resultados .....	16
5. Discussão dos resultados .....	23
6. Conclusão .....	26
7. Bibliografia .....	27

## Lista de Figuras

Figura 1 - Expressão do gene BCL-2 em S, anti-ds DNA, trite lúpica, neurolúpus e nefrite lúpica .....	18
Figura 2 - Expressão do gene Fas-L em LES, anti-ds DNA, artrite lúpica, envolvimento cutâneo e nefrite lúpica.....	19
Figura 3 - Expressão do gene TNF $\alpha$ em LES, anti-ds DNA, artrite lúpica, neurolúpus, envolvimento cutâneo, nefrite lúpica .....	20
Figura 4 - Expressão do gene TNFR1 em LES, anti-ds DNA, artrite lúpica, neurolúpus e envolvimento cutâneo.....	21
Figura 5 - Evolução das amostras L69 e L217.....	22



# Lista de abreviaturas

- ANA- Auto-anticorpo antinuclear
- BcL-2- Linfoma 2 das Células B de leucemia linfóide crónica
- Bak- *BcL-2 antagonist killer 1*
- Bax- *BcL-2 associated x protein*
- Caspases- *Cysteine aspartic acid proteases*
- c-FLIP- *cellular FLICE-like inhibitory proteins*
- CI- Complexos Imunes
- CS- Sistema de Complemento
- DC- Células dendríticas
- DISC- Death inducing Signalling Complex
- DNA- Deoxyribonucleic acid
- HLA- Antígeno Leucocitário Sistémico
- HMGB1- Grupo de proteínas de alta mobilidade
- FADD- Fas-associated Death Domain
- Fas-L- FAS Ligante
- H1- Histona 1
- IC- Complexo Imune
- IFN- $\gamma$ - Interferão gama
- IL- Interleucina
- LES- Lúpus Eritematosos Sistémico
- MAC- Complexo de Ataque à Membrana
- MHC- Complexo Maior de Histocompatibilidade
- MPO- Mieloperoxidase
- NK- Células *Natural Killer*
- NETs- Neutrophil extracellular traps
- NADPH- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- NE- Elastase

pDCs- Células dendríticas plasmocitóides

ROS- Espécies reactivas de Oxigénio

SVV- vasculite de pequenos vasos

TNF- $\alpha$ - Fator de Necrose Tumoral alfa

TLR7- Receptores de *toll-like*

v-FLIP- Fadd- like ICE inhibitory Proteins

# 1. Introdução

## 1.1. Bases da Autoimunidade

O sistema imune adaptativo evoluiu para permitir o reconhecimento e a captura de quaisquer substâncias estranhas ao organismo e assim promover a sua remoção. Não é esperada a existência de linfócitos reativos contra os próprios componentes do organismo, pois existem vários mecanismos inibidores que geram tolerância imunológica. (1)

No período perinatal, com a discriminação do que é próprio (*self*) ao organismo origina-se uma não-reatividade permanente ou tolerância, de modo que, após as células atingirem a maturidade imunológica, existe uma incapacidade de reagirem contra componentes próprios. Esse mecanismo pode falhar em determinado momento, por razões variadas, e promover o aparecimento de auto-anticorpos, podendo provocar doenças auto-imunes. Entre elas, destacam-se as anemias hemolíticas, o Lúpus Eritematoso Sistémico (LES), a Artrite Reumatóide, a Diabetes *Mellitus* tipo I, Doença de Hashimoto entre outras.

A auto-imunidade é a causa de muitas doenças e estima-se que afete cerca de 1% a 2% da população, na sua maioria pessoas do sexo feminino. (1-2) Pode resultar de vários fatores, como falha de deleção de linfócitos auto-reativos; bases genéticas que predis põem à auto-imunidade; mecanismos que levam à lesão tecidual; e as infeções microbianas, que causam uma ativação normal da resposta imune mas acabam por reconhecer indevidamente uma proteína própria do organismo. (3)

Há uma crescente evidência de que as células B e T auto-reativas estão presentes normalmente no organismo. Muitos autores sugerem que auto-anticorpos têm como função promover a marcação de células para a morte, como uma ação fisiológica. No entanto, a principal dificuldade na definição dos mecanismos auto-imunes está na identificação dos antigénios que iniciam a resposta auto-imune e as células que medeiam essas reações. (3-4)

A auto-imunidade inclui todos os mecanismos funcionais do sistema imunológico que estão envolvidos no reconhecimento de constituintes do próprio (o *self*), mecanismos esses que, à luz dos conhecimentos actuais, são intrínsecos ao funcionamento de toda a imunidade adaptativa e, na sua base, essencialmente fisiológicos. De facto, o reconhecimento do *self* é uma característica imprescindível ao desenvolvimento e à

diferenciação linfocitária (selecção tímica), bem como à activação e sobrevivência dos linfócitos (restrição ao complexo major de histocompatibilidade (MHC) e na manutenção da memória imunológica). Assim, a auto-reactividade é, em si, fisiológica e crítica para uma função imunológica normal, ocorrendo caracteristicamente num limiar que não se traduz, nem por agressão orgânica, nem por manifestações clínicas adversas, sendo assim designada de “tolerância imunológica”. (5-6)

A descrição progressiva de diferentes doenças humanas, onde se identificavam auto-anticorpos que reagem com componentes dos órgãos envolvidos, levou ao reconhecimento de que o sistema imunológico pode ser auto-agressivo e, desta forma, à identificação de doenças auto-imunes, sendo que a sua prevalência tem vindo a aumentar nas últimas décadas. (3)

Apesar dos avanços no conhecimento da biologia celular e molecular, do sistema imunológico e da sua avaliação laboratorial permitirem caracterizar muitas doenças auto-imunes, na maioria delas a fisiopatologia continua por esclarecer. A origem das doenças auto-imunes é multifactorial e parece resultar da interacção de factores genéticos e factores ambientais, estudos epidemiológicos, a par de algumas observações clínicas e estudos de imunogenética, os quais têm demonstrado que os factores genéticos são determinantes na susceptibilidade para as doenças auto-imunes. Apesar dos diversos factores genéticos que podem influenciar fortemente a sensibilidade da doença, sabe-se que é necessário um iniciador (ambiental ou interno) para o estabelecimento de uma doença auto-imune. As infecções são consideradas potenciais iniciadores destas doenças em indivíduos predispostos, uma vez que, induzindo frequentemente uma resposta inflamatória intensa, podem contribuir para uma activação policlonal de linfócitos que migram para o local de inflamação e /ou para a libertação de antígenos. (7-8-9)

## **1.2. Fisiopatologia do Lúpus Eritematoso Sistémico**

O Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) é uma doença crónica, sistémica e auto-imune de etiologia e apresentação clínica complexa, onde factores genéticos e ambientais parecem estar envolvidos.

Embora a patogénese do LES não esteja completamente esclarecida está claro que o sistema imune desempenha um papel central. (3)

Considera-se uma doença relativamente rara, com uma incidência de cerca de 5 casos em 100.000 pessoas, com uma clara incidência no sexo feminino, na proporção mulher para homem de 9:1. O predomínio de doenças auto-imunes no sexo feminino parece estar associado à produção de estrogénios que aumentam o número de plasmócitos e a produção de auto-anticorpos. A maioria dos doentes desenvolve a doença entre os 15 e os 50 anos. Nos doentes com LES, é produzido um grande número de diferentes auto-anticorpos, e quase todas as células do sistema imune estão envolvidas no processo da doença, sendo por isso considerada a doença modelo da autoimunidade. (10)

Os corticosteróides e outros agentes citotóxicos utilizados de uma maneira adequada resultam num aumento da sobrevivência dos doentes. Na década de 50, cerca de metade dos pacientes com LES sobreviveu aproximadamente durante 10 anos, na actualidade esse número é superior a 90%. Apesar deste aumento substancial da taxa de sobrevivência, a mortalidade continua a ser alta em determinados casos. Além disso, o envolvimento de vários órgãos e a heterogeneidade da apresentação clínica torna esta doença difícil de tratar e de diagnosticar. (9-10-11)

As principais alterações imunológicas observadas nestes pacientes são a perda de tolerância para auto-antígenos com activação policlonal dos linfócitos B, a produção de diferentes auto-antígenos e a alteração da função das células T.

Os sintomas clínicos comuns no LES incluem erupção cutânea, nefrite, doença do sistema nervoso central e trombocitopenia. O LES é caracterizado pela activação do interferão do tipo I, pela activação do sistema de complemento, auto-anticorpos e destruição dos tecidos. (12)

A produção de anticorpos contra um subconjunto de proteínas nucleares continua a ser uma característica primária para o diagnóstico da doença. No entanto, a utilidade de auto-anticorpos biomarcadores para a sub-classificação da doença permanece indefinida. Os anticorpos anti-nucleares (ANA) são os mais frequentes e estão presentes em 95% dos pacientes com LES, dentro deste grupo encontram-se os anticorpos anti-dulpa cadeia de DNA (ds-DNA) e anti-Smith (anti-sm), que são altamente específicos em doentes com LES e portanto a sua presença está incluída nos critérios de classificação da doença. (13)

Uma característica proeminente do LES é a resposta imune ao ácido nucleico e proteínas associadas, o que resulta na produção de auto-anticorpos e, conseqüente formação de complexos imunes (CI) e inflamação de órgãos. No início da descoberta da

doença a morte resultava maioritariamente da infeção dos principais órgãos. Actualmente as doenças cardiovasculares durante a fase final do LES são um problema mais difícil de tratar, sendo que cerca de 10% de doentes com idade média de 55 anos são afetados por acidentes vasculares cerebrais. (14)

O sistema de complemento está integralmente envolvido na patogénese da lesão tecidual no LES. Deposição das imunoglobulinas no tecido é um aspecto característico do LES e pode causar a activação do complemento através da via clássica. Defeitos quantitativos ou qualitativos de fatores do complemento podem ser responsáveis pela diminuição da capacidade das células fagocíticas em eliminar eficazmente as células apoptóticas. Assim, apesar das deficiências homozigóticas para os fatores C2, C4 ou C1q se tratarem de deficiências raras, qualquer uma delas é um fator predisponente para o desenvolvimento do LES. O sistema de complemento representa a primeira linha de defesa da imunidade inata, que actua facilitando a fagocitose dos CI, agentes patogénicos, células apoptóticas e formação do complexo de ataque à membrana (MAC), resultando na lise celular. Este poderoso sistema é composto por vários componentes, mais de 60 proteínas diferentes estão envolvidas neste processo, que são desencadeados em sistema de cascata tipo I. O complemento, sendo um sistema de defesa central, é imediatamente activado após a entrada de um agente patogénico no hospedeiro. A activação do sistema de complemento é um meio poderoso e importante para iniciar a inflamação, no entanto, pode causar danos graves caso não seja devidamente regulado. (5-6)

A fagocitose é um dos mecanismos principais da imunidade inata; trata-se de um processo pelo qual o material, como as bactérias, é ingerido pelas células fagocíticas e, depois destruído ou neutralizado. Entre os principais tipos de células fagocíticas estão os neutrófilos. Estes circulam no sangue periférico, mas a maior parte, cerca de 90%, encontra-se ligada ao revestimento endotelial dos vasos. Isto explica que possam migrar mais facilmente para os espaços extravasculares, atravessando os vasos, sempre que atraídos por agentes químicos gerados nos focos inflamatórios. (15-16-17)

### **1.3. Neutrófilos na patogénese do Lúpus Eritematoso Sistémico**

Os neutrófilos são células importantes da imunidade inata necessárias para manter a homeostase do organismo, são granulócitos polimorfonucleares com um tempo de semi-vida de curta duração cerca de 24 a 48 horas, e constituem uma defesa primária contra

infecções microbianas. Na inflamação aguda os neutrófilos circulantes são rapidamente recrutados através da corrente sanguínea para o local de infecção, em resposta a fatores quimiotáticos libertados pelos agentes patogénicos ou células hospedeiras. Após a ligação ao endotélio, os neutrófilos deixam os vasos sanguíneos e avançam para o local da infecção, sentindo o gradiente quimiotático. (18) No local da inflamação, as células imunitárias activadas adquirem a capacidade de matar agentes patogénicos. Para cumprir essa tarefa os neutrófilos usam uma série de estratégias, tais como fagocitose, desgranulação e a formação de redes extracelulares, recentemente descobertas. Durante a fagocitose, os agentes patogénicos fagocitados são translocados para fagossomas, local propício para a sua morte com recurso a fatores antimicrobianos derivados das espécies reativas de oxigénio (ROS). O segundo mecanismo designa-se desgranulação, é idêntico à fagocitose, porém neste caso os agentes patogénicos sofrem morte extracelular pelos mesmos fatores antimicrobianos que são lançados fora da célula. Os neutrófilos são células únicas que usam a morte como um mecanismo para modular a inflamação e para assegurar a remoção eficiente de microorganismos durante infecções. Duas formas de morte de neutrófilos têm sido implicadas nestes processos, a apoptose e NETosis. As redes extracelulares de neutrófilos (NETs) podem ser formadas pelos neutrófilos num processo chamado netosis. (19-20)

As redes de contato entre neutrófilos e agentes patogénicos são um género especial de armadilha formada pela descondensação das fibras de cromatina associado aos fatores antimicrobianos entregues pelos grânulos. A principal função dos NETs é agregar e eliminar os patogénios. Netosis é um tipo específico de morte celular diferente tanto da necrose como da apoptose, mas o seu mecanismo é ainda mal compreendido.

A característica mais importante e específica dos NETs é a presença de fibras de DNA nuclear de neutrófilos no espaço extracelular. (21) NETs são produzidos por neutrófilos em contacto com organismos patogénicos tais como bactérias, fungos, vírus e protozoários, com uma variedade de factores do hospedeiro, tais como as plaquetas activadas, estímulos inflamatórios ou com compostos químicos. (22)

Vários fatores estão presentes no processo de netosis, o momento da formação dos NETs, a dependência pela produção de ROS, a sua composição e o seu envolvimento na morte celular varia consoante o estímulo libertado.

Durante a activação, os neutrófilos, produzem grandes quantidades de ROS através da ação da NADPH-oxidase (PHOX) podendo estes ser iniciadores da produção de NETs. (23) Após o estímulo, os neutrófilos sofrem descondensação da cromatina, seguido da mistura de eucromatina e heterocromatina. Este processo é mediado por enzimas armazenadas nos grânulos azurófilos, entre elas a elastase (NE) e a mieloperoxidase (MPO), que são transferidas para o núcleo por um mecanismo ainda pouco esclarecido. Primeiro, ocorre a degradação da elastase pelo ligando da histona H1 e das histonas presentes no núcleo, conduzindo à descondensação da cromatina que é reforçada pela MPO, independentemente da atividade enzimática da MPO. Durante a formação dos NETs a histona H3 sofre uma alteração, chamada citrulinização, que consiste na conversão de resíduos de arginina em citrulina. Posteriormente, a membrana do núcleo é danificada, causando a expansão da cromatina dentro da célula que se mistura com os fatores granulares antimicrobianos. O ponto final do processo sucede com a ruptura da membrana da célula libertando os NETs e expelindo o conteúdo intracelular em estrutura de rede para o espaço extracelular. As redes são capazes de reter quase todos os tipos de agentes patogénicos, mesmo aqueles tão grandes que não podem ser fagocitados, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, leveduras, vírus e protozoários. Além da função antibacteriana dos NETs a formação excessiva pode causar vários efeitos patológicos. A formação dos NETs foi observada na aterosclerose (doença inflamatória crónica), no LES (doença auto-imune), em diversas formas de vasculite, trombose pulmonar aguda e no cancro. As mudanças morfológicas resultantes da NETosis têm sido observadas detalhadamente através de microscopia eletrónica e imunofluorescência. (24-25-26)

Doenças auto-imunes, tais como vasculite de pequenos vasos (SVV) ou lúpus eritematoso sistémico (LES) são outro exemplo do lado escuro da produção da NET. Embora o desenvolvimento de doença auto-imune seja um processo altamente complexo, a exposição extracelular e intracelular de antigénios é geralmente aceite como o passo fundamental na resposta auto-imune e na produção de auto-anticorpos. Neutrófilos em doentes com LES são ativados, constata-se esta que está correlacionada com um aumento do nível de DNA que circula no plasma de doentes com LES, bem como com a presença de anticorpos contra as proteínas. A tolerância observada aos CI presentes nos doentes com LES resulta em inflamação e danos em vários órgãos. Além disso, os CI estimulam outros



neutrófilos a produzir NETs que ativam as células dendríticas plasmacitóides através dos receptores *Toll-Like* (TLR7) que secretam interferon alfa (IFN- $\alpha$ ). (28)

Desde a descoberta do processo NET, tem havido um interesse renovado nos neutrófilos como um potencial condutor de doença auto-imune. Os neutrófilos têm sido implicados numa variedade de papéis em doenças auto-imunes sistémicas. Isto resulta da capacidade dos neutrófilos usarem diversas “capas” durante o curso de uma resposta imune. Os neutrófilos são reconhecidos como fagócitos, secretores de citocinas. O principal papel dos neutrófilos de curta duração é a defesa do hospedeiro, acumulando-se rapidamente nos locais da lesão tecidual, na presença da infecção, protegendo contra a invasão das bactérias ou fungos.

Os neutrófilos estão presentes em número elevado nos locais de danos auto-imunes. (26)

#### **1.4. Apoptose no Lúpus Eritematoso Sistémico**

Embora a fisiopatologia do LES não esteja completamente compreendida, considera-se que as anormalidades no processo apoptótico possam estar envolvidas no desenvolvimento da doença. Um atraso na depuração de células apoptóticas foi analisado em doentes com LES. Uma diminuição da purificação dos detritos apoptóticos, pelos fagócitos, pode ocorrer devido a uma anomalia específica nos recetores destas células, a opsonização reduzida dos corpos apoptóticos ou uma diminuição do número de células fagocitárias. (27) Nos doentes com LES observa-se uma apoptose acelerada das células circulantes, durante esta, os auto-antígenos são expostos à superfície das células. As principais características do fenómeno de apoptose são o *blebbing* da membrana, a clivagem de DNA e a degradação dos componentes celulares. Durante a apoptose, as proteínas intracitoplasmáticas são clivadas e algumas delas são fosforiladas. Também tem sido descrito que, durante a apoptose ocorre um aumento da metilação anormal do ADN. (29)

Acredita-se que as células apoptóticas são eficientemente removidas pelo seu reconhecimento pelas células do reticuloendotelial, sistema de receptores de superfície, tais como CD36, recetor eliminador, e o receptor da fosfatidilserina (CD68). (30)

Alguns destes receptores também exercem uma influência sobre as citocinas libertadas pelos fagócitos. Além do reconhecimento do receptor de superfície, uma série de proteínas, por exemplo, componentes do sistema do complemento, podem actuar como

opsoninas para fagócitos. A apoptose é também essencial para o estabelecimento de tolerância imune.

A apoptose acelerada pode ser consequência direta de alterações nas proteínas/genes relacionados com a morte celular programada como o Fas/Fas-L e o Bcl-2. A apoptose celular pode ser induzida por estímulos como a hipóxia, factor de necrose tumoral (TNF), isquémia/ reperfusão e espécies reactivas de oxigénio. A apoptose é o mecanismo pelo qual os neutrófilos envelhecidos morrem, a fim de manter a homeostasia. A eliminação rápida e eficiente de células mortas e detritos é, portanto, fundamental para evitar a acumulação de células velhas, danificadas, infectadas ou perigosas. (31-32)

A morte celular foi há muito tempo implicada no processo do LES e, por razões históricas, tem sido o processo mais extensamente estudado, no entanto, a recente constatação de que o processo NETosis pode reproduzir as características imunológicas inicialmente atribuídos a apoptose em doenças auto-imunes sistémicas tem exposto um nível até então desconhecido de complexidade no papel de morte celular em autoimunidade. Um papel central para a apoptose na patogénese da doença auto-imune, começou a surgir em 1990 quando alguns estudos forneceram evidências de que a apoptose era um motorista de inflamação na autoimunidade. Observou-se que nucleossomas libertados a partir de células que morreram por apoptose podem estimular a produção de anticorpos anti-DNA *in vitro*, e sugeriu que este processo pode ocorrer *in vivo* no LES. Identificou-se em doentes com LES a existência de DNA circulante "muito parecida com a Escada de 200 pb característica encontrada com DNA oligonucleosomal " segundo os autores sugerindo que este DNA pode ser produzido por células apoptótica. Embora o modelo de apoptose tenha ganho relevo, estando relacionado com a patogénese das doenças auto-imunes, não houve evidência direta de que as células mortas ou a morrer fossem participantes ativas no processo de auto-imunidade. Isso culminou em 1994, quando estudos foram publicados, colocando a apoptose celular no centro das atenções como um fator importante na patogénese do LES. Com base nestes estudos, a apoptose tem-se tornado uma parte crítica do modelo patogénico da doença de auto-imune, e tem sido amplamente considerado como a fonte de auto-antígenos (por exemplo, DNA e RNP) e adjuvantes (por exemplo, o grupo de proteínas de alta mobilidade HMGB-1) que podem desencadear e potenciar o processo da doença auto-imune. (33-34)

De acordo com as últimas recomendações do "Comité de Nomenclatura de morte celular", a morte celular pode ser dividida em três grandes grupos: a morte celular programada, regulamentada e acidental. (34)

Morte programada aplica-se a casos fisiológicos de morte celular que ocorrem no contexto do desenvolvimento e da homeostasia do tecido embrionário / pós-embrionário (por exemplo, apoptose e necroptose). O termo morte regulamentada é usado para indicar casos de morte celular - sejam elas programadas ou não - cuja iniciação e / ou execução seja mediada por um mecanismo molecular específico, o que implica que pode ser inibido por meios farmacológicos e / ou intervenções genéticas (por exemplo, a morte autofágica e a NETosis. Morte acidental indica a morte celular provocada por condições físicas extremamente agressivas (por exemplo, ciclos de congelação/descongelação ou altas concentrações de pró-oxidantes), que não pode ser inibida por ação farmacológica e / ou por manipulação genética, apresentando geralmente características morfológicas de necrose. A forma de morte acidental é a necrose secundária, que é definida como um processo autolítico de desintegração celular com libertação de componentes celulares que ocorre quando não há intervenção de células fagocíticas após a morte das células estar concluída.

Há células que podem conter mais do que um programa de morte celular, podendo seleccionar os modos de morte específicas, dependendo dos estímulos do meio ambiente. No entanto, uma vez que a célula está programada para morrer de uma forma específica, este programa parece ser irreversível e, em alguns casos, incompatível com as outras formas de morte.

Assim, existem vários tipos de morte que parecem ser antagonistas, não podendo coexistir na mesma célula porque a ativação de uma via de morte inibe a outra, por exemplo, apoptose e NETose ou apoptose e necroptose. (35)

### **1.5. Fas-L no Lúpus Eritematoso Sistémico**

A morte celular programada pode ser induzida por duas vias: pela via mediada por receptores ou extrínseca, que proporciona a activação da caspase-8, e pela via mitocondrial ou intrínseca que estimula a activação da caspase-9. As caspases pertencem à família de proteases efectoras das vias apoptóticas (com uma cisteína no domínio catalítico) que clivam, ao nível da porção C terminal, os resíduos de aspartato. A apoptose via Fas/Fas-L (via extrínseca) é desencadeada pela interacção entre o Fas e o seu ligando.

O Fas é expresso por uma vasta variedade de células, sendo o Fas-L um membro da família do TNF. A disfunção do complexo Fas/Fas-L pode representar um factor crucial responsável pelo defeito apoptótico das células T no LES.

O Fas-L é uma proteína de membrana tipo II e é expresso principalmente por células NK, células T e macrófagos. Esta proteína pode ser clivada por uma metaloproteinase presente na membrana, tornando-o solúvel (sFas-L). O nível de sFas-L encontra-se aumentado nos locais de lesão sendo considerada uma citocina local. Quando a apoptose via Fas/ Fas-L ocorre, os receptores formam agregados que, na forma de trímeros, se ligam à proteína adaptadora FADD (*Fas-associated death domain*) presente no citoplasma. Ocorre, então, a ligação dessas moléculas à pró-caspase-8, resultando na formação de um complexo denominado DISC (*Death Inducing Signalling Complex*), que culmina na auto-clivagem e activação da caspase-8. A caspase-8 pode, assim, directamente ou pela via mitocondrial, activar a caspase-3 efectora, resultando na apoptose celular. O recrutamento e activação da pró-caspase-8 são regulados por proteínas anti-apoptóticas, como o v-FLIP e c-FLIP (*FADD-like ICE inhibitory proteins*). Essas proteínas competem com a caspase-8 pelo sítio de ligação do complexo Fas-FADD e inibem a apoptose celular. (36-37-38)

### **1.6. BCL-2 no Lúpus Eritematoso Sistémico**

Em doentes com LES a disfunção da apoptose pode resultar na longevidade inapropriada de células B auto-reactivas, o que permite atingir níveis de auto-anticorpos patogénicos. Esta hipótese surge como resultado de estudos que revelam ligações de importância e duas moléculas que influenciam a apoptose. Estas são a Bcl-2, que aumenta a sobrevivência celular inibindo ou atrasando a apoptose, e o Fas, uma molécula da superfície celular envolvida na indução da apoptose.

O gene Bcl-2 é mais expresso nas células B e células T dos doentes com LES. O aumento da expressão de Bcl-2 observada em células linfóides a partir de doentes com LES.

A desregulação apoptótica da via “intrínseca” está associada ao desenvolvimento de cancro e de doenças auto-imunes. Bak e Bax são dois membros pró-apoptóticos da família Bcl-2, com papéis essenciais na via intrínseca da apoptose. A sua actividade é essencial no controlo da sobrevivência celular durante o desenvolvimento e homeostasia

dos linfócitos. Por sua vez, o papel de Bak e Bax na tolerância imunológica e na prevenção de doença auto-imune permanecem obscuros.(39)

No entanto, o papel do Fas e da Bcl-2, na regulação da sobrevivência dos linfócitos no LES é ainda pouco claro e investigações adicionais sobre o papel destas moléculas no fenómeno auto-imune do LES são, ainda, necessárias. (40-41-42)

### **1.7. TNF- $\alpha$ no Lúpus Eritematoso Sistémico**

TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que promove a apoptose afectando significativamente a actividade das células B, T e células dendríticas (DCs). A concentração de TNF- $\alpha$  é superior no soro de doentes com LES, e está intimamente associada com a actividade da doença. Estas descobertas, sustentam um papel patogénico do TNF- $\alpha$  nas doenças inflamatórias. (43)

A função do TNF- $\alpha$  no desenvolvimento do LES está ainda por esclarecer, no entanto, são vários os mecanismos que têm sido propostos para explicar a ocorrência da doença. Por exemplo, o TNF- $\alpha$  suprime a produção de citocinas Th1, aumentando assim a resposta imune levando à produção de citocinas do tipo Th2, como é a IL-10 e o IFN- $\alpha$ , o chamado "desvio de citocina", levando à produção de auto-anticorpos.

Estudos anteriores demonstraram uma hiperatividade da via do IFN-  $\alpha$  em doentes com LES e outras doenças auto-imunes. Alguns destes estudos mostram que a produção de IFN-  $\alpha$  pelas células dendríticas plasmocitóides (pDCs) estimuladas com RNA que contenham complexos imunes pode ser desregulada pelas células NK e inibida pelos monócitos. Outro exemplo baseia-se na suposição de que a inibição sistémica do TNF- $\alpha$  poderia interferir com a apoptose, diminuindo expressão de CD44, o que afeta a depuração de resíduos nucleares e neutrófilos apoptóticos por fagócitos e, assim, promovem a produção auto-anticorpos contra outros antígenos nucleares. (44-45)

## 2. Objetivos

O LES é considerado o protótipo da doença auto-imune, tendo como base o grande número de auto-anticorpos diferentes que são produzidos nestes doentes, em que a maioria das células do sistema imune está envolvida no processo da doença.

O LES é caracterizado pela infiltração de leucócitos nos tecidos alvo levando à lesão desses tecidos.

Embora a fisiopatologia do LES não esteja completamente compreendida, considera-se que as anormalidades no processo apoptótico possam estar envolvidas no desenvolvimento da doença. A apoptose acelerada pode ser consequência direta de alterações nas proteínas/genes relacionados com a morte celular programada como o Fas/Fas-L (receptor de morte) e o Bcl-2 (linfoma 2 de célula B). A apoptose celular pode ser induzida por estímulos como a hipóxia, factor de necrose tumoral (TNF), isquémia/ repurusão e espécies reactivas de oxigénio. A apoptose é o mecanismo pelo qual os neutrófilos envelhecidos morrem, a fim de manter a homeostasia.

Neste contexto, os objectivos do presente trabalho são:

- 1- Quantificar a expressão de mRNA de Bcl-2, Fas-L, TNFR1 e de TNF $\alpha$  em neutrófilos do sangue periférico purificados por *cell sorting* em doentes com LES e num grupo controlo.
- 2- Relacionar essa expressão com parâmetros de severidade da doença.

## 3. Material e Métodos

### 3.1. Grupos de estudo

Para realizar este estudo foram utilizadas amostras de sangue periférico de um grupo de indivíduos com LES e de um grupo controlo. A recolha das amostras do sangue periférico (SP) decorreu no Serviço de Reumatologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e no Centro de Histocompatibilidade do Centro. Todos os doentes com LES preenchiam os critérios preliminares definidos pelo Colégio Americano de Reumatologia.(61) Este estudo teve o consentimento informado (respeitando os princípios da Declaração de Helsínquia) de todos os doentes/controlos que participaram, sendo que o protocolo de estudo foi aprovado pelo Comité de Ética do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra.

Do grupo controlo fizeram parte 30 adultos saudáveis, isentos de doenças inflamatórias com uma média de idades  $30\pm 6$  anos. Os doentes com LES foram subdivididos consoante o sexo e o subtipo clínico da doença, de acordo com *LeRoy* (62): o grupo de doentes com LES era constituído por 45 mulheres e 4 homens com uma média de idades de  $35,3\pm 11,5$  e  $23,5\pm 4,2$  anos, respetivamente; o grupo de doentes com LES Inativo era constituído por 4 homens com uma média de idades de  $23,5\pm 4,2$  anos e 27 mulheres com uma média de idades de  $37,7\pm 11,3$ ; o grupo de doentes com LES ativa é constituído por 18 mulheres com uma média de idades de  $31,8\pm 11,8$ .

### 3.2. Amostras

As amostras de sangue periférico, de cada doente e dos indivíduos do grupo controlo, foram colhidas para tubos de *PAXgene Blood RNA Tube* (PreAnalytiX GmbH, Suíça) e para tubos de EDTA (Vacurette, América do Norte), no dia da inclusão e avaliação clínica. As amostras foram enviadas para o laboratório e processadas sem conhecimento da fase da doença dos doentes.

### 3.3. Ética

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comité de Ética dos CHUC. Todos os participantes leram e assinaram o consentimento informado, tendo sido respeitados todos os princípios da Declaração de Helsínquia.

### 3.4. Análise da Expressão Génica

O estudo da expressão do RNAm da Bcl-2, Fas-L, TNFR1 e TNF $\alpha$  em neutrófilos do sangue periférico, foram separados por *cell sorting*. Para a separação de neutrófilos, adicionaram-se 3mL, de cada amostra colhida, em EDTA K3 a 10 mL de uma solução de NH<sub>4</sub>Cl com o objectivo de lisar os glóbulos vermelhos. Após 20 minutos de incubação, as amostras foram centrifugadas e o sedimento das células corado. Uma vez incubadas durante 20 minutos à temperatura ambiente, as células foram lavadas e ressuspensas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Bibco BRL-life Technologies, Vienna, Austria).

A extração automática de RNA total foi realizada no equipamento QIAcube (Qiagen, Hiden, Alemanha), recorrendo ao *Kit RNA purification in QIAcube*.

A integridade e quantificação do RNA foram analisadas através do 6000 Nano Chip Kit RNA, no bioanalisador Agilent 2100 (Agilent, Walbronn, Alemanha).

Um micrograma de RNA sofreu transcrição reversa para CDNA, através do Kit *iScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR* (Bio Rad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, no termociclador *DNA Engine Thermal Cycler* (Bio-Rada, CA, EUA).

A quantificação relativa da expressão génica através da reacção de PCR em tempo real, foi realizada no termociclador LightCycler 480 II (Roche, Basel, Suíça), utilizando-se para tal o kit *Quantitect Primer Assaya* (Qiagen, Hilden, Alemanha) com primers otimizados para Bcl-2, Fas-L, TNFR1 e TNF $\alpha$  de acordo com as instruções do utilizador.

Recorreu-se ao Kit *geNorm Housekeeping Gene Selection Human* (Primer Design, Southampton, Inglaterra) e ao kit *geNorm software* (Ghent University Hospital, Center for Medical Genetics, Ghent, Bélgica) para a seleção dos genes de referência e para a normalização dos dados.

Os genes de referência utilizados, para a análise da expressão génica foram o CyC1 (QT00209454) e GAPDH (QT01192646). As reacções seguiram o seguinte perfil térmico:



10 minutos a 95°C mais 50 ciclos de 10 segundos a 95°C, 20 segundos a 55°C e 30 segundos a 72°C.

Os resultados da PCR em tempo real foram analisados com o software LightCycler 480 (Roche, Basel, Suíça) e os níveis de expressão do gene de interesse normalizado calculados através do método delta-Ct.

### **3.5. Análise Estatística**

Para a análise estatística utilizou-se o *software Statistical Package for Social Sciences SPSS 17.0* (IBM, Armonk, NY, EUA), recorrendo-se aos testes não paramétricos *Mann-Whitney U* e *Chi-Square*, para amostras independentes. As diferenças encontradas entre os grupos em estudo, foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

Foi realizado o estudo da expressão genética de genes associados à apoptose nos neutrófilos do sangue periférico purificados por *cell sorting* num grupo de doentes com LES activo, de LES Inactivo e num grupo controlo. Em 2 doentes com LES activo realizou-se um estudo longitudinal para averiguar se alterações na expressão dos genes estudados se relacionavam com a manutenção de doença activa ou com transição para doença inactiva.

Pela análise da Figura 1, verificou-se que o gene BCL-2 apresenta uma menor expressão em LES, particularmente em doença inativa comparativamente aos grupos de LES ativo e controlo, embora sem atingir significado estatístico. A positividade/negatividade para os anticorpos anti-DS DNA não se relaciona com alterações na expressão genética de Bcl-2. No entanto, esta expressão sofre um ligeiro aumento, embora sem significado estatístico, na presença de artrite ou de nefrite lúpica.

Pela análise da Figura 2 verificou-se que na doença activa ocorre uma diminuição na expressão genética de Fas-L quando comparada com a obtida no grupo LES inactivo e no grupo controlo, embora sem significado estatístico. O mesmo se verifica no grupo com título de anticorpos anti-DS DNA moderado a alto. Não se observaram alterações de relevo na expressão de Fas-L com base em parâmetros de severidade da doença, como a artrite lúpica, envolvimento cutâneo e na nefrite lúpica.

No estudo da expressão genética TNF $\alpha$  observou-se uma diminuição desta no grupo LES activo comparativamente com o grupo LES inactivo e com o grupo controlo, o mesmo ocorrendo quando se verifica a presença de envolvimento cutâneo, de nefrite lúpica e na ausência de artrite lúpica (Figura 3).

Pela análise da Figura 4 verificou-se que a expressão genética de TNFR1 esta aumentada em LES, mais acentuada na fase activa da doença, bem como, na presença de títulos moderados a altos de anticorpos de anti-ds DNA, na presença de artrite lúpica e de envolvimento cutâneo, sendo este aumento estatisticamente significativo.

Na Figura 5 está representado a expressão genética de TNFR1 ao longo do tempo (3 avaliações), em dois doentes com LES activo. O doente L69 pertence ao grupo de LES activo e o estágio da doença permanece inalterado ao longo das 3 avaliações. Pelo contrário, o doente L217 pertence ao grupo de LES activo e na terceira avaliação transitou

para doença inativa. Neste ultimo caso observou-se valores de TNFR1 inferiores à média dos de doença inativa, o que não sucedeu no doente L69 encontrando-se, estes, sempre superiores à média dos obtidos no grupo de LES inativo.

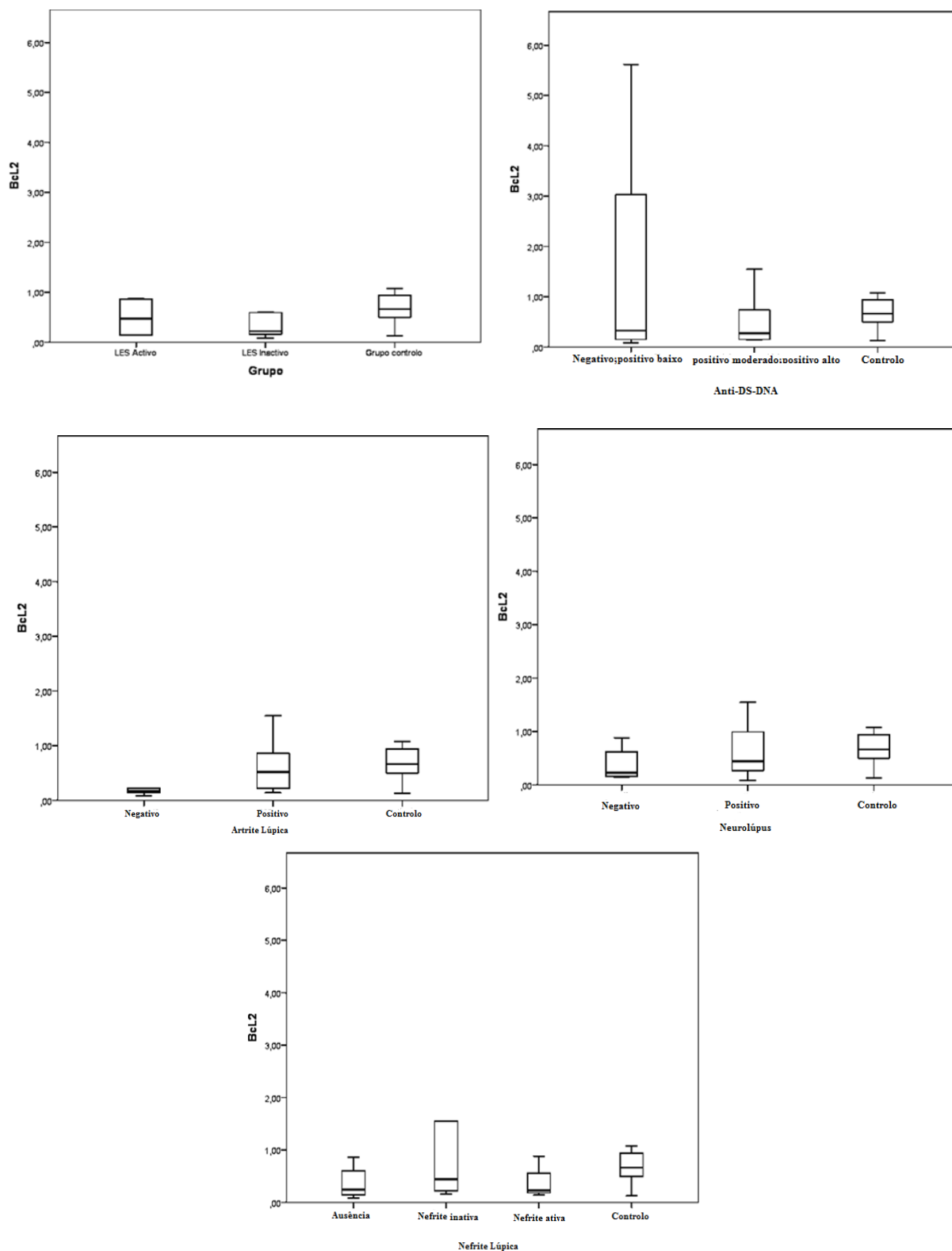


Figura 1 - Expressão do gene BCL-2 em LES ativo, inactivo e no grupo controle; anti-ds DNA negativo/positivo baixo, positivo moderado/positivo alto; artrite lúpica negativa, positiva; neurolúpus negativo, positivo; nefrite lúpica com ausência, nefrite inactiva, nefrite activa.

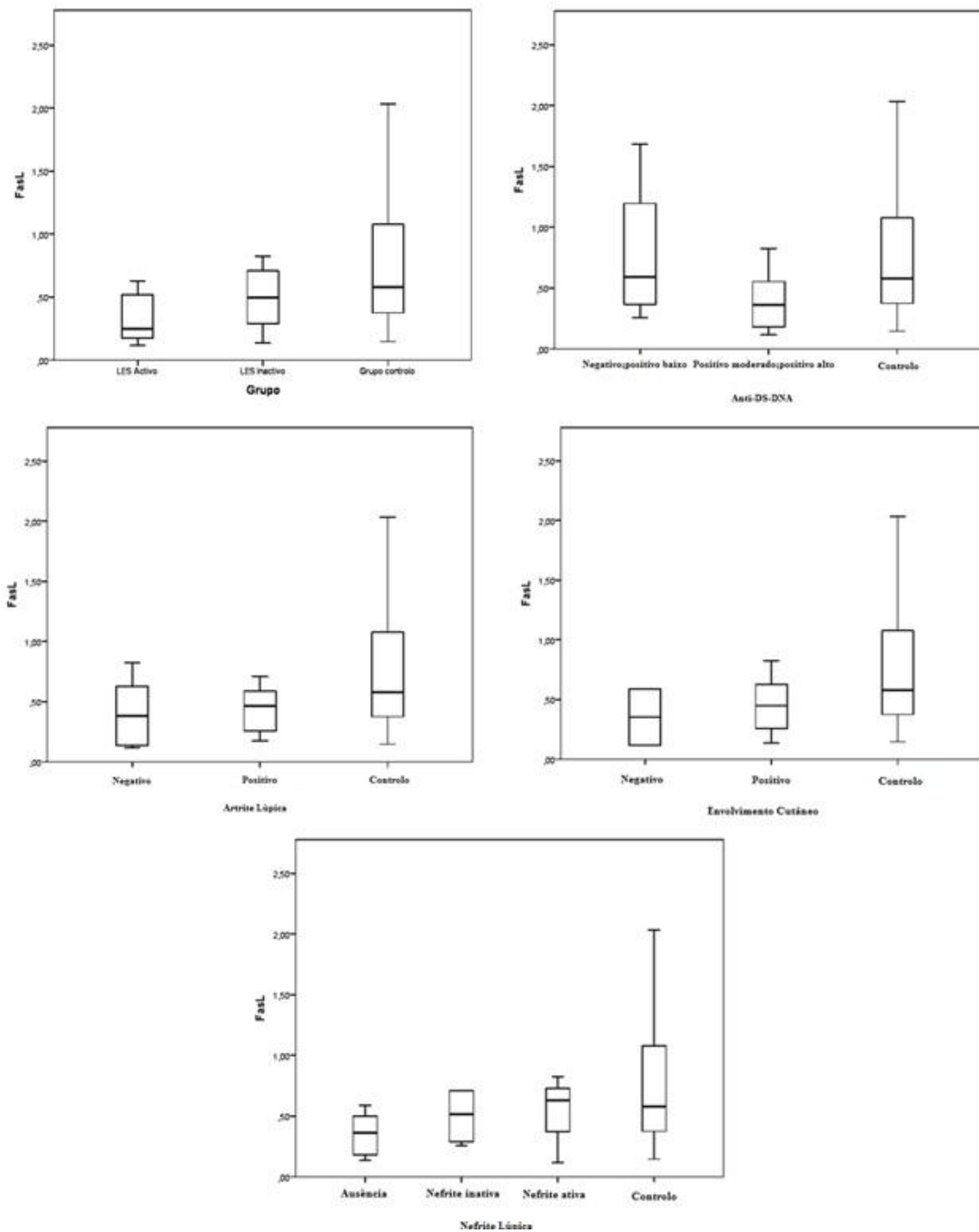


Figura 2 - Expressão do gene Fas-L na doença LES com o grupo controlo; anti-ds DNA negativo/positivo baixo, positivo moderado/positivo alto, grupo controlo; artrite lúpica negativa, positiva, grupo controlo; envolvimento cutâneo negativo, positivo e grupo controlo; nefrite lúpica ausência, nefrite inactiva, nefrite activa e grupo controlo.

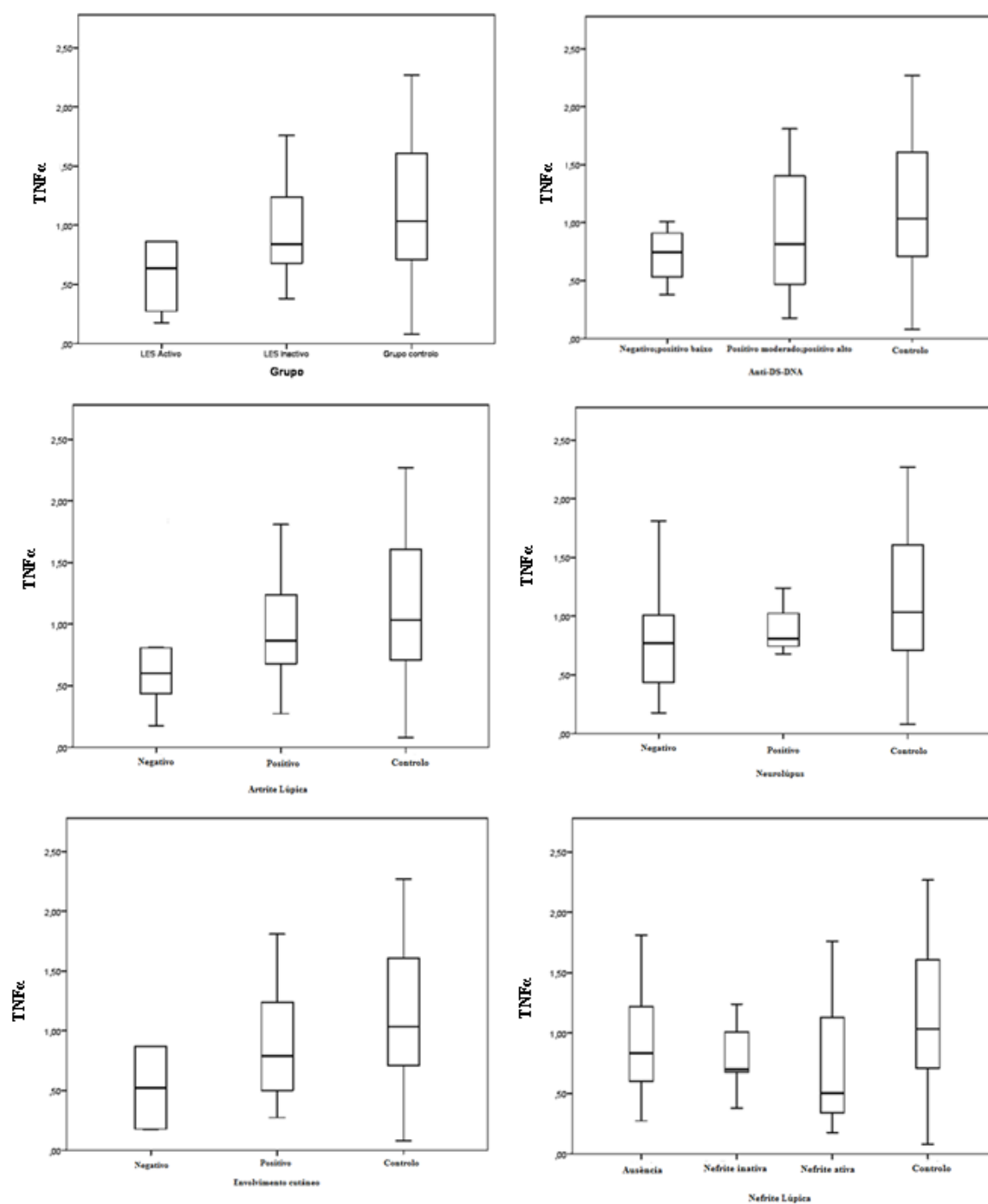


Figura 3 - Expressão do gene TNF $\alpha$  na doença LES com o grupo controle; anti-ds DNA negativo/positivo baixo, positivo moderado/positivo alto, grupo controle; artrite lúpica negativa, positivo, grupo controle, neurolúpus negativa, positiva e grupo controle; envolvimento cutâneo negativo, positivo e grupo controle; nefrite lúpica na ausência de nefrite, nefrite inactiva, nefrite activa e grupo controle.

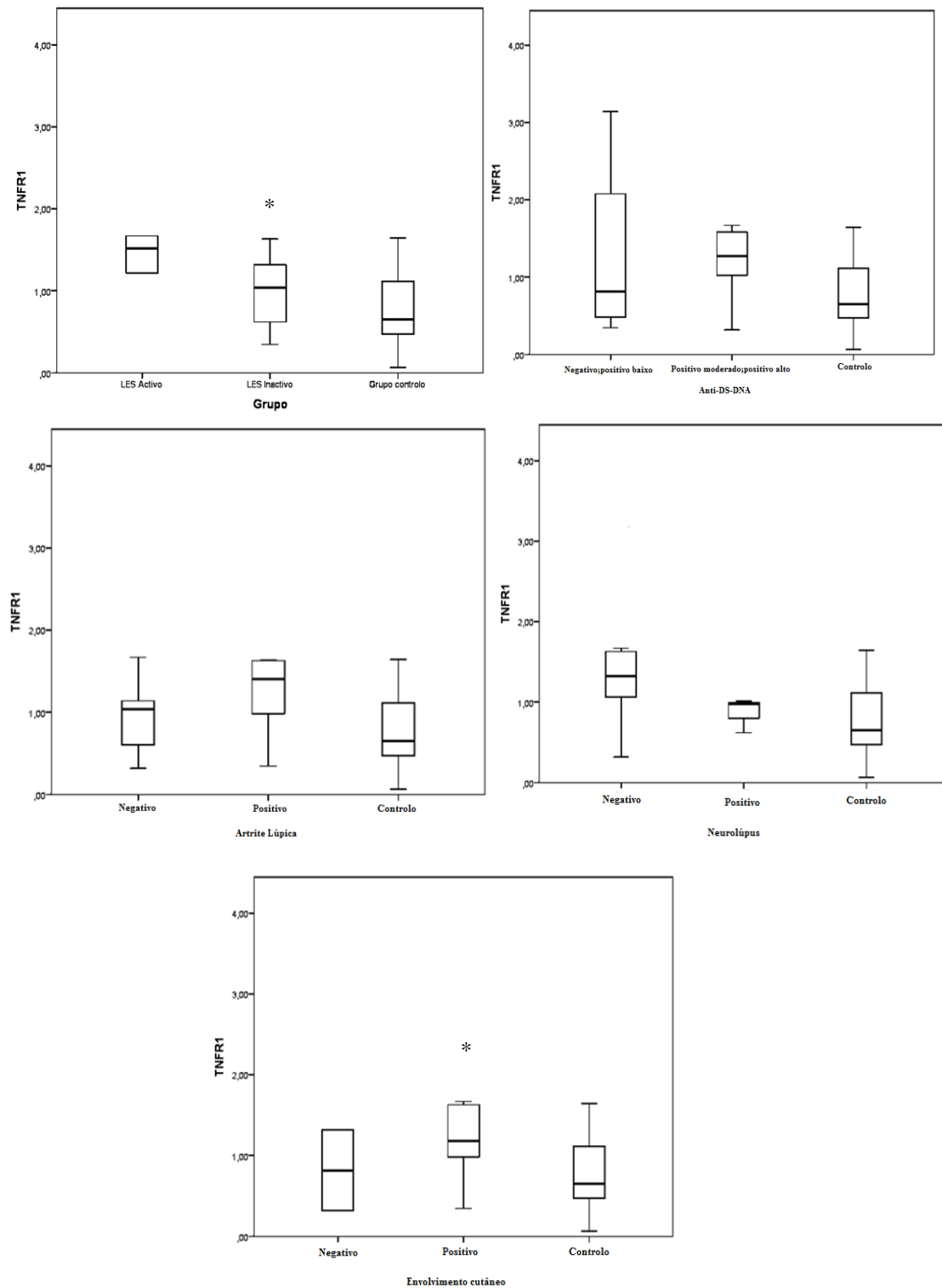


Figura 4 - Expressão do gene TNFR1 na doença LES com o grupo controllo, anti-ds DNA negativo/positivo baixo, positivo moderado/positivo alto, grupo controllo; artrite lúpica negativa;positivo, grupo controllo; neurolúpus negativo, positivo e grupo controllo; e envolvimento cutâneo negativo, positivo e grupo controllo. \*  $p < 0,05$  quando se comparou o grupo LES activo com o grupo controllo.

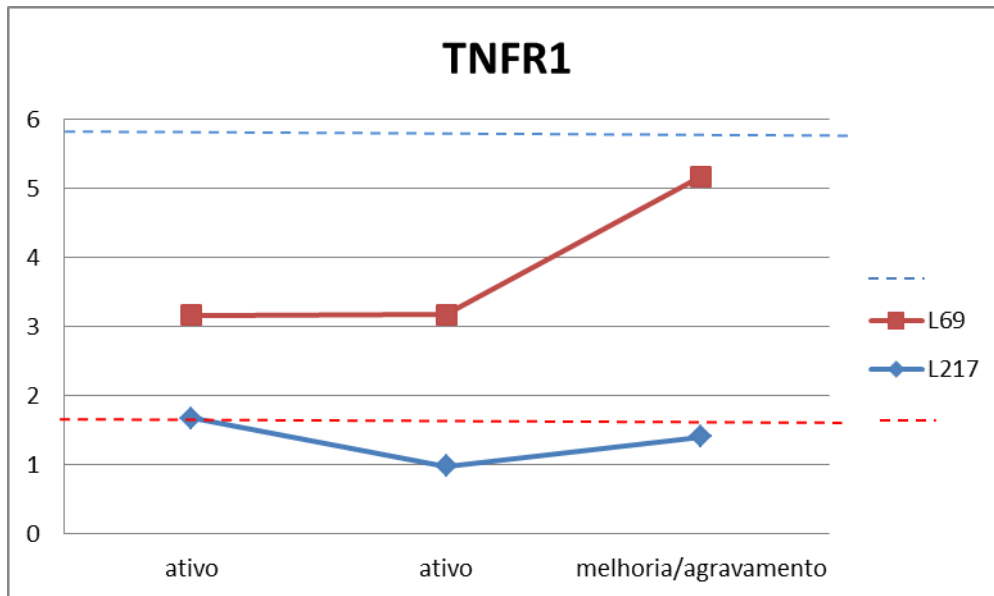


Figura 5 - A amostra L69 é um caso de LES activo sem alteração do seu estado. A amostra L217 é um caso de LES activo que na 3 avaliação muda para LES inactivo. O tracejado azul representa a média da expressão genética de TNFR1 no grupo de doença inactiva; o tracejado vermelho representa a média da expressão genética de TNFR1 no grupo de doença activa.



## 5. Discussão dos resultados

O LES é uma patologia inflamatória auto-imune caracterizada pelo envolvimento de múltiplos órgãos. Os critérios de classificação do LES incluem anemia hemolítica, leucopenia e trombocitopenia. A neutropenia em doentes com LES pode ocorrer como resultado de reações auto-imunes, medicamentos ou disfunção da medula óssea no decurso da doença. Têm sido descritos níveis significativamente maiores de neutrófilos em apoptose no sangue periférico de doentes com LES. Estudos publicados doentes em estádios inactivos e doentes na fase activa de LES e verificaram que o índice de apoptose se encontrava aumentado nesses doentes. (46)

O estudo da apoptose reveste-se assim de muita importância, uma vez que este processo participa em muitas condições fisiopatológicas, garantindo a homeostasia do sistema imune, e a sua desregulação está associada a uma série de desordens como doenças auto-imunes, imunodeficiência e cancro. Uma das causas mais comuns de mortalidade no LES é a infeção durante o primeiro ano após o diagnóstico da doença. Sabe-se que a desregulação imunológica, que ocorre nesta patologia desempenha um papel importante na iniciação e desenvolvimento da doença. (47)

Neste estudo, em particular, fomos avaliar a expressão de genes que estão envolvidos no processo de apoptose, como o Fas-L, BCL-2, TNF $\alpha$  e o TNFR1 em neutrófilos do sangue periférico de doentes com LES e de um grupo controlo.

O achado mais relevante deste estudo foi o aumento da expressão genética de TNFR1 em LES activo quando comparado com o grupo LES inactivo, atingindo valores estatisticamente significativos.

O TNF $\alpha$  é produzido em resposta a estímulos inflamatórios ou infecciosos principalmente por macrófagos e linfócitos, mas também por neutrófilos, fibroblastos e astrócitos. Os seus níveis séricos correlacionam-se com a gravidade das infeções. Este exerce os seus efeitos ligando-se a receptores específicos denominados TNFR1 e TNFR2. O receptor mais abundante é o TNFR1 e a sua ocupação activa cascatas que, em células diferentes, podem levar à sobrevivência, proliferação e à diferenciação celular ou à apoptose. As ações intracelulares do TNF $\alpha$  são mediadas principalmente pelo TNFR1 enquanto a função do TNFR2 é principalmente moduladora, potencializando a associação do TNF $\alpha$  com o TNFR1. (44-48-49)

O aumento da expressão de TNFR1 verificado em LES activo em associação com a menor expressão de Bcl-2, também verificada neste mesmo grupo, pode significar uma maior predisposição dos neutrófilos do sangue periférico para a morte celular por apoptose em doentes com LES. Estes achados estão de acordo com outros publicados na literatura. (50) A expressão de mRNA de TNFR1 foi também estudada em dois doentes com LES activo ao longo do tempo. O doente L69 pertence ao grupo de LES activo mantendo-se esta situação clínica inalterada ao longo das três avaliações. O outro doente L217, também, pertence ao grupo de LES activo mas na última avaliação transitou para o estágio de doença inactiva. Apesar de este estudo ter sido feito somente em 2 doentes, e por consequência, não se poder tirar grandes conclusões, os resultados obtidos sugerem que se a expressão de TNFR1 em doentes com LES activo for de uma maneira geral baixa, que isso pode ser um bom indicador que a doença pode ser controlada e passar para um estágio de doença inactiva.

Relativamente à expressão de mRNA de TNF $\alpha$ , não se observaram, neste estudo, alterações relevantes entre os diferentes grupos. Têm sido descritos níveis aumentados de TNF $\alpha$  no soro de doentes com LES e que estão normalmente associados à fisiopatologia da doença e à inflamação crónica presente nestes doentes. No entanto, estudos publicados referentes à sua expressão em neutrófilos separados não existem, o que sugere que esse aumento verificado no soro de doentes com LES pode ser devido a uma maior produção por parte de outras células do sistema imune, como monócitos e/ou células dendríticas, que tem sido referido na literatura, apesar da terapêutica com imunossuppressores e corticoesteróides. (45)

No LES parece ocorrer um desequilíbrio entre os genes anti-apoptóticos e pró-apoptóticos estando as células mais sensíveis à morte por apoptose. A família Bcl-2 é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte celular por apoptose que participam activamente na regulação da mesma, tendo como função a indução e/ou bloqueio da morte celular programada.

A expressão de mRNA de Bcl-2 neste estudo, de uma maneira geral, está sempre diminuída no grupo de doentes com LES, particularmente em doença inactiva, relativamente ao grupo controlo. Uma vez mais não existem artigos em neutrófilos isolados do sangue periférico, no entanto, alguns autores como Aringer *et al* sugerem (1994) que os linfócitos T de doentes com doença activa apresentam um aumento da

expressão de Bcl-2 comparativamente com controlos saudáveis, o que pode estar associado à manutenção de células T memória auto-reactivas de vida longa em circulação, que podem contribuir para a manutenção e perpetuação do fenómeno de auto-imunidade.

A expressão genética de Fas-L, neste estudo, encontrou-se, também, diminuída no grupo de doentes com LES activo. A expressão de Fas-L é um mecanismo para eliminar as células disfuncionais pela via de sinalização Fas/Fas-L. Neste sentido, o facto de haver, em princípio, menos proteína na membrana do neutrófilo, pode significar uma menor contribuição destas células para os níveis de Fas-L solúvel. Esta hipótese não está de acordo com o publicado na literatura, que refere, em LES e particularmente em doença activa, um aumento da percentagem de casos onde foi possível obter doseamento de Fas-L, associado a uma diminuição de casos com doseamento de Fas. (52). Neste mesmo estudo, os autores observaram uma menor percentagem de células T a expressar Fas, e que isso se associava a um maior índice de apoptose nessas células. Pelo contrário, o facto de haver menor expressão de Fas-L nos neutrófilos pode tornar estas células mais vulneráveis à morte por apoptose induzida por células efectoras, estas com expressão elevada de Fas-L na membrana.

De facto, uma desregulação anormal das diferentes vias de sinalização envolvidas na morte celular por apoptose, têm sido associadas com a fisiopatologia do LES. (51).

De uma maneira geral, os resultados obtidos neste estudo, apontam para uma maior susceptibilidade dos neutrófilos do sangue periférico e doentes com LES (maior expressão de mRNA de TNFR1 associado à menor expressão de Bcl2 e de Fas-L), o que corroborado por Courtney A *et al* (1999), que associa o aumento da morte celular por apoptose de neutrófilos circulantes em LES com a actividade da doença, com o nível de auto-anticorpos anti-dsDNA e com a neutropenia observada nesta doença. Os mesmos autores referem inclusive, que a inibição da apoptose nos neutrófilos pode representar um mecanismo importante no tratamento de erupções cutâneas em doentes com LES. (49)

## 6. Conclusão

Neste estudo observaram-se alterações na expressão genética de genes associados à morte celular por apoptose, em neutrófilos do sangue periférico de doentes com LES, sendo o resultado mais relevante o aumento da expressão genética de TNFR1 em LES activo. Também se observou uma menor expressão genética de Bcl2 e de Fas-L nestas células, embora sem atingir significado estatístico, que no seu conjunto, apontam para uma maior susceptibilidade dos neutrófilos à morte celular por apoptose, fenómeno este, que pode contribuir para a própria etiologia e/ou fisiopatologia e para a neutropenia observada em LES.

Estudos longitudinais, com base na estratégia utilizada neste estudo, com transições entre doença activa e inactiva e vice-versa, podem vir a contribuir para a identificação de biomarcadores preditivos da actividade da doença e de monitorização terapêutica.

## 7. Bibliografia

1. Ali Y, Kozodov N, Ali T. Polyglandular autoimmune syndrome type 2: diagnosed in the intensive care unit. *Immunity*. 2012 DEC; 4(6): 170-172.
2. Haastert B, Mellanby RJ, Anderton SM, O'Connor RA. T cells at the site of autoimmune inflammation show increased potential for fagocytosis. *Journal. pone*. 2013 Dec 4;8(12):e81404
3. D Cruz DP, Khamasha MA, Hughes GR. Systemic Lupus Erythematosus. *Lancet*. 2007;369:587-96
4. Carneiro- Sampaio M, Liphau B, Jesus AA, Silva CA, Oliveira JB, Kiss MH. Understanding Systemic Lupus Erythematosus Physiopathology in the Light of Primary Immunodeficiencies. *JClin Immunol* 2008;28 (Suppl 1): S34-41
5. Petri M. Epidemiology of Systemic Lupus Erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2002. 16:847-858
6. Sestak AL, Furnohr BG, Haeley JB, Merrill JT, Namjou B. The genetics of Systemic Lupus Erythematosus and implications for targeted therapy. *Ann Rheum Dis*. 2011;70 Suppl 1:i37-43
7. Shirai T, Hirose S. Molecular pathogenesis of SLE. *Springer Semin Immun*. 2006 28:79-82
8. Mok C, Lau S. Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Pthol*. 2003;56(7): 481-490
9. Ghaussy NO, Sibbitt WL Jr, Qualls CR. Cigarette smoking, alcohol consumption, and the risk of Systemic Lupus Erythematosus: a case-control study. *J Rheumatol*. 2002;28:2449-2453
10. Hardy CJ, Palmer BP, Muir KR, Sutton AJ, Powell RJ. Smoking history, alcohol consumption, and Systemic Lupus Erythematosus: a case-control study. *Ann Rheum Dis*. 1998;57:451-455
11. Bijl M, Kallenberg CG. Ultraviolet light and cutaneous lupus. *Lupus*. 2006;15:724-727
12. Mok CC, Lau CS, Wong RW. Use of exogenous estrogens in SLE. *Semin Arthritis Rheum*. 2001;30:426-435

13. Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrenst W. Delineating the genetic basics of Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity*. 2001;15 (3): 397-408
14. Munoz LE, Gaipf US, Franz S, et al. SLE- a disease of clearance deficiency *Rheumatology*. 2005; 44: 1101-7
15. Baumann I, Kolowos W, Vill RE, et al. Impaired uptake of apoptotic cells into tangible body macrophages in germinal centers of patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2002;46:191-201
16. Walport MJ. Complement and Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3: S279-S293
17. Hermann M, Voll RE, Kalden JR. Etiopathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Immunol Today* 2000;21(9):424-6
18. John J, Connolly and Hakonarson H. Role of cytokines in Systemic Lupus Erythematosus: recent progress from GWAS and sequencing Feb 2012
19. Akgul, C.; Moulding, D.A.; Edwards, S.W. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Letters*. 487: 318-322, 2001
20. Allgaier, B.; Shi, M.; Luo, D.; Koenig, J.M. Spontaneous and Fas-mediated apoptosis are diminished in umbilical cord blood neutrophils. *J. Leukoc. Biol*. 64(3):331-336.
21. Alvarado-kristensson, M.; Pörn-ares, M.I.; Grethe, S.; Smith, D.; Zheng, L.; Andersson, T. p38 Mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activities have opposite effects on human neutrophils apoptosis. *FASEB J*. 16:129-131, 16 2002.
22. Avdi, N.J.; Malcolm, K.C.; Nick, J.A.; Worthen, G.S A role for protein phosphatase- 2A in p38 mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of the c-Jun NH(2)- terminal kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem*.; 277(43):40687-40696:2002.
23. Babior, B.M. NADPH oxidase: An update. *Blood* 93:1464-1476, 1999.
24. Zawrotniak M, Rapala M. Neutrophil Extracellular traps (NETs)- formation and implications. Jun 2011.
25. Darrah E, Andrade F. NETs: The missing link between cell death and systemic autoimmune diseases Jan 3013.
26. Kaplan M. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE.

27. Moore K, Chow O, Zizet V. Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation. Jun 2012.
28. Daniel NN, Korsmeyer SJ. Cell Death: critical control points. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):205-19.
29. Yeretssian G, Labbe K, Saleh M. Molecular regulation of inflammation and cell death. *Cytokine*. 2008 Sep; 43(3): 380-90.
30. Opferman JT. Apoptosis in the development of the immune system. *Cell Death Differ*. 2008 Feb; 15 (2):234-42.
31. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews*. 2008 Mar;9 (3): 231-41.
32. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGohon AJ, Rader JA van Schie RC, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *The Journal of Experimental Medicine*. 1995 Nov;182 (5): 1545-56
33. Stasser A, O Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Ann Rev Biochem*. 2000;69:217-45
34. Poon IK, Hulett MD, Parish CR. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differ*. 2010 Mar; 17(3):381-97
35. Autret A, Martin SJ. Emerging role for members of the Bcl-2 family in mitochondrial morphogenesis. *Molecular Cell*. 2009 Nov 13;36 (3):355-63
36. Adam- Klagles S, Adam D, Janssen O, Kabelitz D. Death receptors and caspases: role in lymphocyte proliferation, cell death, and autoimmunity. *Immunologic Research*. 2005;33 (2): 149-66
37. Itoh N, Nagata S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993 May 25;268 (15):10932-7
38. Chinnaiyan AM, O Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 1995 May 19;81(4):505-12
39. Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization trends in cell Biology. 2008 Apr;18(4):157-64

40. Lessene G, Czabotar PE, Colman PM. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Dec; 7 (12): 989-1000
41. Mrtinez-Cballero S, Dejean LM, Kinnally MS, Oh KJ, Mannella CA, Kinnally KM. Assembly of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC. *The Journal of Biological Chemistry.* 2009 May1; 284 (18):12235-45
42. Louge SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc trans.* 2008 Feb; 36 (PT1):1-9
43. Jianrong L, Andrew J, Steelman, Smith R, Jane C. Apoptosis TNF and promotes Encephalitogenic T-cell Galectin-9 is Up- regulated in Astrocytes. July 2013
44. Nishitani Y, Yoshida M, Azuma T, Mizuno M. Intestinal Anti-Inflammatory Activity of Lentinan: Influence on IL-8 and TNFR1 Expression in Intestinal Epithelial Cells, 2008 May
45. Henriques A, Inês L, Carvalheiro T, Couto M, Andrade A, Pedreiro S, Laranjeira P, Morgado JM, Pais ML, da Silva JA, Paiva A. Functional characterization of peripheral blood dendritic cells and monocytes in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 2012 Apr;32(4):863-9. doi: 10.1007/s00296-010-1709-6. Epub 2011 Jan 8
46. Rahman A, I Senberg DA. Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine.* 2008;358(9):929-39
47. Lit LC-W, Wong C-K, Li EK.M, Tam LS. Elevated gene expression of Th1/Th2 associated transcription factors is correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythrmatosus. *The journal of Rheumatology.* 2007 January 1, 2007;34(1):89-96
48. Balakumar P, Singh M. Anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  in heart failure: future directions. *Pharmacol Toxicol.* 2006;99:392-7
49. Courtney A, Criackarts D, Williamson K, Irvine A, Kennedy R, Bell A. Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with disease activity, antibodies to double stranded DNA, and neutropenia. *Ann Rheum Dis.* 1999;58:309-314
50. Grivicich I, Regner A, Brondani A. Apoptosis: Programmed Cell Death. *Jan* 2007;67:207-54



51. Tauzin S, Delalandes B et al. The Naturally Processed CD95L Elicits a c-Yes/Calcium/PI3K-Driven Cell Migration Pathway. 2001;87:121-345
52. Tinazzi E, Pucetti A, Gerli R, Rigo A, Migliorini P, Simeoni S. Serum DNase I, soluble Fas/Fas-L levels and cell surface Fas expression in patients with SLE: a possible explanation for the lack of efficacy of hrDNase I treatment. *International Immunology*, Vol. 21, No. 3, pp. 237–243