

**PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FABIO – Faculdade de Biociências
PPGBCM – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**ANÁLISE DAS VARIANTES POLIMÓRFICAS DO ÉXON 1 DO GENE QUE
CODIFICA LECTINA DE LIGAÇÃO A MANOSE (*MBL2*) EM PACIENTES COM
ARTRITE REUMATÓIDE**

**Autor
Fernanda Letícia Martiny**

**Orientador
Maurício Reis Bogo**

**Porto Alegre
2011**

**PUCRS – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FABIO – Faculdade de Biociências
PPGBCM – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**ANÁLISE DAS VARIANTES POLIMÓRFICAS DO ÉXON 1 DO GENE QUE
CODIFICA LECTINA DE LIGAÇÃO A MANOSE (*MBL2*) EM PACIENTES COM
ARTRITE REUMATÓIDE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular
da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul
para obtenção do grau de
mestre.

Autor

Fernanda Letícia Martiny

Orientador

Maurício Reis Bogo

Porto Alegre
2011

*Dedico este trabalho a minha família
(pai, mãe, noivo e irmãos) que sempre
estiveram ao meu lado, me apoiando.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo milagre da vida.

Ao meu orientador Maurício Reis Bogo pela confiança em mim depositada, pela oportunidade e pelos ensinamentos trocados.

Ao meu, pode-se dizer orientador Zeca (José Arthur Bogo Chies) pela paciência, pelo grande auxílio, pelo incentivo e principalmente pelo estímulo.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular pela contribuição a minha formação.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS pelos momentos de aprendizagem e de fortes discussões científicas, principalmente a Cláudia Sarturi.

Aos colegas do Laboratório de Imunogenética da UFRGS pela paciência e disponibilização de seu tempo para me auxiliarem na bancada, em especial ao colega Tiago Degani Veit pelo auxílio na análise dos resultados.

Aos colegas do mestrado pelas experiências e ensinamentos trocados, em especial Stefânia Richetti e Kelen Rocha pelas horas de discussões, pela amizade, apoio e companheirismo.

Aos meus irmãos Luis Eugênio, Pedro Ivo e João Vicente pela força e ajuda.

Ao meu noivo Everson Ferreira Menezes pelo apoio incondicional, carinho, paciência, amor e ensinamentos, por me dar força e nunca me deixar desanimar. Obrigada Bem, por estar sempre do meu lado.

Aos meus Pais Ailton Décio Martiny e Rosani Martiny que sempre acreditam na minha capacidade e por me dar a oportunidade de realizar mais este sonho.

Aos indivíduos que participaram deste estudo fornecendo material biológico.

A CAPES pela bolsa de estudos que possibilitou a realização deste mestrado.

RESUMO

A artrite reumatóide é uma doença do sistema auto-imune que atua através de uma inflamação nas articulações tornando-se crônica com o passar dos anos, podendo desenvolver uma deformidade e destruição destas articulações devido à erosão da cartilagem e do osso. Esta doença atinge pessoas de ambos os sexos com idades variáveis. O diagnóstico da doença depende de uma série de combinações de sintomas clínicos, diagnósticos laboratoriais e radiográficos. A etiologia da AR é multifatorial, resultando da interação de fatores ambientais, hormonais e genéticos, que contribuem para sua ocorrência e expressão. Evidências epidemiológicas mostram que fatores genéticos são relatados como risco para o aumento da AR. Acredita-se que vários genes possam estar envolvidos com o aparecimento da AR, e um deles é o gene *MBL2*, responsável pela codificação da proteína Lectina de Ligação à Manose. A MBL é uma proteína da família das colectinas importante para o sistema imunológico, relacionada com a promoção de fagocitose de microorganismos, modulação da resposta inflamatória e apoptose. Os baixos níveis séricos de MBL estão associados com mutações genéticas através de polimorfismos do gene *MBL2*. Três polimorfismos de base única (SNPs) foram localizados no éxon 1 nos códons 52 (alelo variante D), 54 (alelo variante B) e 57 (alelo variante C). A presença de qualquer uma dessas variantes é chamada de alelo O, enquanto que a ausência das variantes em qualquer uma das três posições é chamada alelo A. Neste estudo, analisamos o polimorfismo do gene *MBL2* em 322 pacientes brasileiros com AR e 343 indivíduos saudáveis através da técnica de sequenciamento. Quando comparamos indivíduos saudáveis euro-descendentes e afro-descendentes observamos uma diferença significativa nas frequências genótípicas e alélicas, isto devido a frequência maior do alelo C (pacientes euro-descendentes 0.0220 vs. Pacientes Afro-descendentes 0.205, controles euro-descendentes 0.029 vs. Controles afro-descendentes 0.144, valores $P < 0.001$). Também analisamos o genótipo MBL em relação a manifestações extra-articular. Quando consideramos as variantes MBL juntas, nós encontramos um aumento da frequência do genótipo OO em pacientes com nódulos reumatóides ($P = 0.031$). Estes achados sugerem uma associação do genótipo OO e a severidade da doença, entretanto mais estudos são necessários pra esclarecer a verdadeira função da MBL na AR.

Palavras chave: Mannose Ligada a Lectina, Artrite Rreumatóide, Variantes Polimórficas

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease that operates through joint inflammation becomes chronic over the years and may develop a deformity and destruction of these joints due to erosion of cartilage and bone. This disease affects people of both sexes and varying ages. The diagnosis depends on a number of combinations of clinical symptoms, laboratory and radiographic diagnostics. The etiology of RA is multifactorial resulting from the interaction of environmental factors, hormonal and genetic factors that contribute to its occurrence and expression. Epidemiologic studies show that genetic factors are reported as increasing the risk for RA. It is believed that several genes may be involved with the onset of RA, and one of them is the *MBL2* gene, responsible for encoding the protein Mannose binding lectin. MBL is a protein family of collectins important for the immune system, related to the promotion of phagocytosis of microorganisms, modulation of inflammatory response and apoptosis. The low serum levels of MBL are associated with genetic mutations by *MBL2* gene polymorphisms. Three single nucleotide polymorphisms (SNPs) were located in exon 1 at codons 52 (variant allele D), 54 (variant allele B) and 57 (variant allele C) the presence of any of the variant alleles (B, C or D) has been collectively labeled O, whereas the simultaneous absence of variants at the three positions has been called allele A. We analyzed *MBL2* gene polymorphisms in 322 Brazilian patients with RA and 343 healthy controls ethnically matched through sequencing. When we compared European-derived and African-derived controls we observed a significantly difference in both, genotypic and allelic frequencies, particularly concerning the frequency of the C allele (European-derived patients 0.0220 vs. African-derived patients 0.205, European-derived controls 0.029 vs. African-derived controls 0.144, both P-values <0.001). We also analyzed MBL genotype in relation to extraarticular manifestations. When considering MBL variants together we found an increased frequency of the OO genotype among patients with rheumatoid nodules (P=0.031). This finding suggests an association of the OO genotype and disease severity, but more studies are needed to clarify the true role of MBL in RA.

Key-words: Mannose-Binding Lectin, Rheumatoid Arthritis, Polymorphic variants

ÍNDICE

1 CAPÍTULO 1	8
1.1 Introdução	8
1.1.1 Artrite Reumatóide	8
1.1.2 MBL	11
1.2 Objetivos.....	17
2 CAPÍTULO 2 – Artigo Científico.....	18
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
REFERÊNCIAS	32
ANEXO	38

1 CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

1.1.1 Artrite Reumatóide

A artrite reumatóide (AR) é uma doença do sistema imune de caráter inflamatório, que atua primeiramente através de uma inflamação nas articulações tornando-se crônica com o passar dos anos. O indivíduo com AR pode desenvolver uma deformidade e destruição das articulações devido à erosão da cartilagem e do osso (KORB; PAVENSTADT; PAP, 2009). A AR é caracterizada por uma inflamação na membrana sinovial, esta estrutura é responsável por envolver a articulação. A membrana sinovial tem por função produzir o líquido sinovial que nutre e lubrifica a superfície da articulação permitindo o seu movimento. Quando um indivíduo predisposto é exposto a um agente desencadeante (antígeno) forma-se um complexo processo inflamatório na membrana sinovial. Esta membrana torna-se inflamada, mais espessa e aumenta de volume devido a produção de um líquido inflamatório que invade o osso, destrói as cartilagens e os ligamentos levando ao dano, deformidade articular e conseqüentemente dificultando o movimento e causando dor (TAVARES et al, 2000).

Atualmente, esta doença atinge pessoas de ambos os sexos com idades variáveis, porém há uma prevalência maior em mulheres com idade entre 40 e 60 anos (PAN; GABAY; FINCKH, 2007). Na população mundial há uma prevalência de aproximadamente 0,5% a 1% de pessoas com AR sendo que em mulheres é de 1,37% e entre homens é de 0,74% (ANDERSON et al, 1985; GABRIEL, 2001). De acordo com Lee; Weinblatt (2001) e Silman; Pearson (2002) não foram encontrados casos de AR na parte rural da África do Sul dentre 500 indivíduos analisados. Na

Ásia existe uma prevalência de 0,3% principalmente em países como China e Japão. Entretanto, em tribos indígenas da América do Norte há uma prevalência de 5,3 a 6,0% (alguns dados podem ser vistos na tabela 1), porém não foi possível identificar se existe alguma relação entre a AR e a situação sócio-econômica (ALAMANOS; DROSOS; 2005). No Brasil, foi realizado um estudo multicêntrico em 1999 que constatou uma prevalência de AR em adultos variando de 0,2% a 1% (LOUZADA et al, 2007).

Atento a esses dados e com a preocupação de uma abordagem de tratamento diferenciada, o Ministério da Saúde publicou o “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Artrite Reumatóide” (Portaria MS nº855 de 22 de novembro de 2002), o qual é de grande valia para a sociedade brasileira. Além disto, a Sociedade Brasileira de Reumatologia também demonstrou o seu interesse e desenvolveu o Consenso Brasileiro para o Diagnóstico e tratamento da Artrite Reumatóide, o qual foi atualizado em 2007 (BÉRTOLO et al., 2007; LAURINDO; PINHEIRO; XIMENES et al, 2002;).

Tabela 1: Prevalência e incidência de AR no mundo (ALAMANOS; DROSOS; 2005).

População		Prevalência	Incidência
América do Norte	Estados Unidos (população em geral)	0.9- 1.1	0.02-0.07
	Estados Unidos (população nativa)	5.3–6.0	0.09–0.89
Norte da Europa	Inglaterra	0.8–1.10	0.02–0.04
	Finlândia	0.8	0.03–0.04
	Suécia	0.5–0.9	
	Noruega	0.4–0.5	0.02–0.03
	Dinamarca	0.9	
	Irlanda	0.5	
Sul da Europa	Espanha	0.5	
	França	0.6	0.01
	Itália	0.3	
	Grécia	0.3–0.7	0.02
	Iugoslávia	0.2	

América do sul	Argentina	0.2	
	Brasil	0.5	
	Colômbia	0.1	
Ásia	Japão	0.3 0.04	0.09
	China	0.2–0.3	
	Taiwan	0.3	
	Indonésia	0.2–0.3	
	Philippines	0.2	
	Paquistão	0.1	
Oriente médio	Egito	0.2	
	Israel	0.3	
	África	0.3	

De acordo com estes estudos, o diagnóstico da Artrite Reumatóide depende de uma série de combinações de sintomas clínicos, diagnósticos laboratoriais e radiográficos. Segundo o *American College of Rheumatology* (2002), alguns sintomas da AR são: rigidez matinal, artrite de três ou mais áreas (pelo menos três áreas articulares com edema de partes moles ou derrame articular), artrite de articulação das mãos (punho, interfalanges proximais), nódulo reumatóide, fator reumatóide sérico positivo e alterações radiográficas como erosões ou descalcificações localizadas em punhos e mãos. Para classificar um paciente com AR é necessário que pelo menos quatro destes sete critérios estejam presentes. Além disto, o paciente sente muita dor, apresenta inchaço das articulações, fraqueza, cansaço, febre, perda de peso e depressão (LEE; WEINBLAT, 2001). Mais tardiamente pode aparecer subluxação, eritema e diminuição da extensão do movimento. Ainda, podem aparecer sintomas extra-articulares, como por exemplo: vasculite sistêmica, queratoconjuntivites, fibrose pulmonar, miocardite, pericardite podendo levar a insuficiência cardíaca congestiva e infarto agudo do miocárdio (TORIGOE; LAURINDO, 2006), instabilidade cervical, anemia, trombocitose, leucocitose e linfadenopatia (ARNETT; EDWORTHY; BLOCH et al, 1988)

Estudos indicam que 20% das pessoas param suas atividades profissionais dois anos após o diagnóstico de AR e aproximadamente 50% tornam-se inaptas para trabalhar após dez anos de doença (YOUNG et al, 2002).

A etiologia da AR é multifatorial, resultando da interação de fatores ambientais, hormonais e genéticos, que contribuem para sua ocorrência e expressão. Estudos têm comprovado que fatores ambientais aumentam o risco de desenvolver AR e também de piorar o prognóstico dos pacientes. Entretanto, o mecanismo pelo o qual estes fatores aumentam o risco de desenvolver e expressar a doença, ainda está incerto. Por outro lado, evidências epidemiológicas mostram que fatores genéticos são relatados com o risco de desenvolvimento de AR (ALAMANOS; DROSOS; 2005).

Acredita-se que vários genes possam estar envolvidos com o aparecimento da AR, e um deles é o gene *MBL2*, responsável pela codificação da proteína Lectina de Ligação a Manose (MBL). Estudos realizados sugerem a relação entre polimorfismos do gene *MBL2* e a suscetibilidade em desenvolver AR em pacientes indianos (GUPTA et al, 2005; GUPTA et al, 2006).

1.1.2 MBL

A MBL é uma proteína sérica da família das colectinas, caracterizada pela presença de três cadeias idênticas de polipeptídios com peso molecular de 32KDa. Cada cadeia tem uma região C-terminal, um domínio de reconhecimento de carboidrato dependente de cálcio (CRD), uma α -hélice curta, região pescoço hidrofóbica, uma região colágeno, e uma região N-terminal rica em cisteína (Figura 1A). As três cadeias de polipeptídios formam uma tripla hélice com as regiões colágenos estabilizadas por interações hidrofóbicas e interações dissulfeto com a

região N-terminal rica em cisteína (Figura1B) (ARNOLD, 2006; DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006).

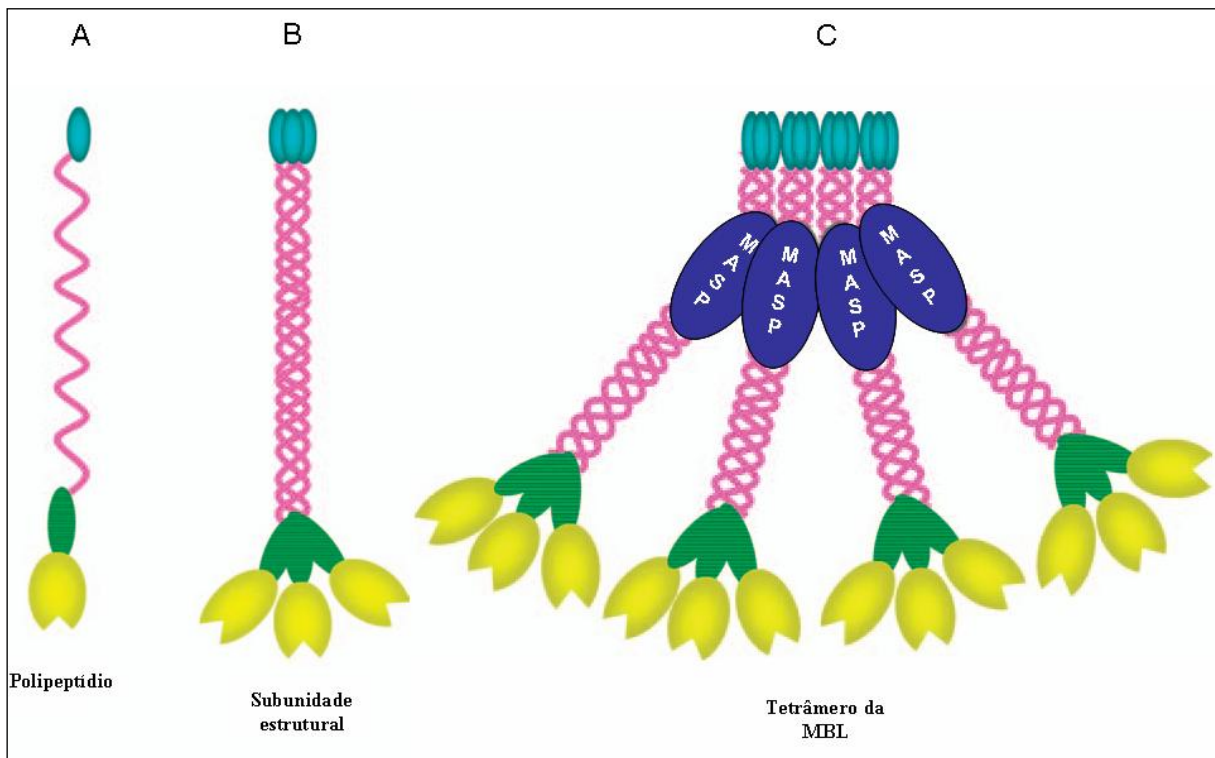


Figura 1: Estrutura da proteína MBL (adaptado de DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006).

A MBL é produzida pelo fígado, sendo esta, uma molécula extremamente importante para o sistema imunológico, pois é estruturalmente semelhante a C1q (componente intermediário da ativação da via clássica do sistema complemento) e tem um papel homólogo a ela. Desta forma, esta proteína apresenta importantes funções como, por exemplo: ativação do sistema complemento através da via das lectinas, opsonização de micro-organismos, ativação de macrófagos, modulação da resposta inflamatória e apoptose (TURNER et al., 1996; KILPATRICK, 2003; TURNER, 2003).

O sistema complemento consiste em uma cascata bioquímica que faz parte do sistema imune. Sua principal função é na resposta inflamatória (TURNER, 2003; DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006). Trata-se de um sistema composto por cerca de 30 proteínas que circulam no plasma ou se encontram em superfícies. O sistema

complemento atua de várias maneiras, como por exemplo, na defesa contra micro-organismos, na ativação de leucócitos e na morte celular (WALPORT, 2001).

O sistema complemento pode ser ativado através de três vias principais: via clássica, via alternativa e a via das lectinas. Todas as vias convergem para a ativação do componente central ou C3. A via clássica tem relação com a resposta imune específica do hospedeiro e sua ativação depende da produção de anticorpos e da formação de complexos antígeno-anticorpo. A via alternativa é ativada e aumenta na presença de superfícies ativadoras adequadas como as paredes celulares das bactérias e fungos. A via das lectinas participa da resposta inata, e é ativada pela ligação da MBL ao açúcar (manose) presente na superfície de micro-organismos. A MBL também pode ativar a via clássica do sistema complemento através de proteínas denominadas ficolinas, ou também através da associação da MBL com as MASPs (*MBL-associated serine proteases*) (Figura 1C), pois este complexo é semelhante a C1r e C1s, componentes necessários para que ocorra a cascata de ativação. Posteriormente, foi descoberto que a MASP-2 era o componente que se ligava a MBL para clivar C4 e C2 gerando C3 e também que MASP-1 ligado a MBL gerava C3 diretamente (Figura 2) (DOMMETT; TURNER et al., 1996; KLEIN; TURNER, 2006).

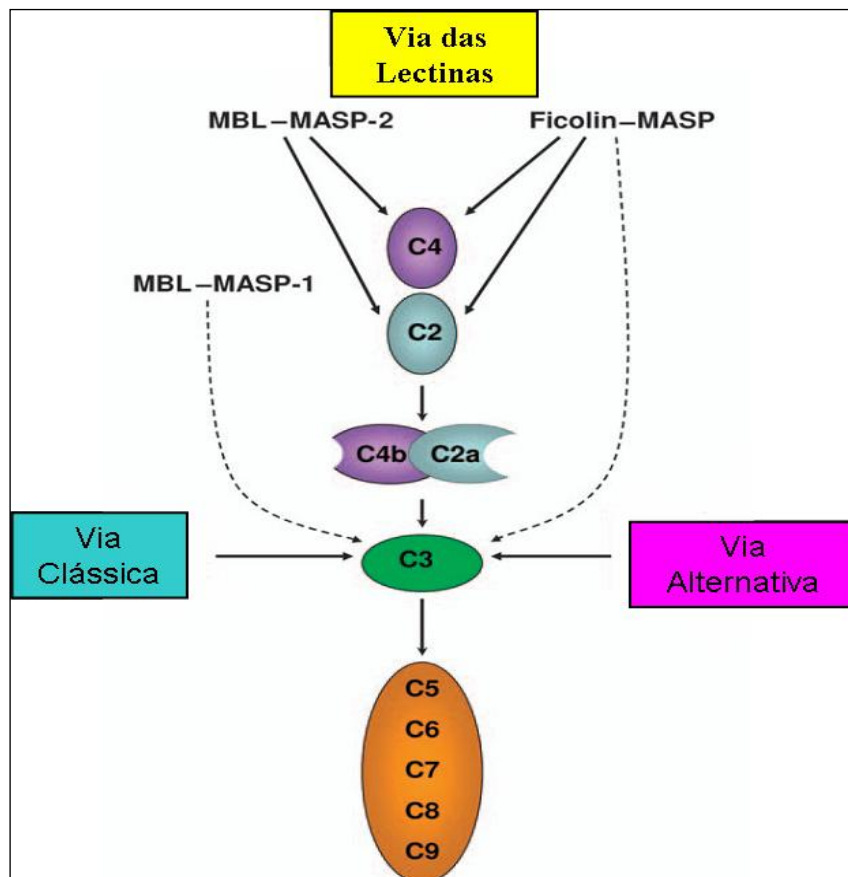


Figura 2: Via de ativação do complemento (adaptado de DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006).

Ainda, é possível induzir a ativação da via complemento através da interação da MBL com a IgG. Este complexo acumula-se nas articulações das pessoas acometidas pela AR (GUPTA et al, 2005).

Altos níveis séricos de MBL estão associados com a deficiência de algumas moléculas do sistema complemento alterando a atividade deste sistema (GUPTA et al, 2005). Na deficiência de níveis séricos de MBL as condições de inflamação crônica podem ser mais graves. Baixos níveis de MBL estão associados com mutações genéticas, através de polimorfismos do gene *MBL2* e a possível produção de anticorpos anti-MBL (MADSEN et al, 1994).

A MBL é codificada pelo gene *MBL2* localizado no braço longo do cromossomo 10 q11.2-21 e contém 4 éxons. Três polimorfismos de base única (SPNs) foram localizados no éxon 1 nos códon 52 (alelo D), 54 (alelo B) e 57 (alelo

C) (MADSEN et al, 1994; MADSEN et al, 1995). A ausência de qualquer destas variantes, e consequente estado selvagem nestes três sítios, caracteriza o alelo A. As variantes são: no códon 52 a substituição de um C para T que leva à substituição de uma arginina por cisteína, no códon 54 um G para A (glicina para ácido aspártico) e no códon 57 substituição de G para A (glicina para ácido glutâmico). Estas substituições causam mudanças estruturais que determinam baixos níveis de MBL no plasma (GUPTA et al, 2005; GARRED et al., 2003). O éxon 2 codifica uma região rica em cisteína e uma região de colágeno, o éxon 3 codifica a região pescoço e o éxon 4 codifica um domínio de ligação de carboidrato (Figura 3) (DOMMETT; KLEIN; TURNNER, 2006).

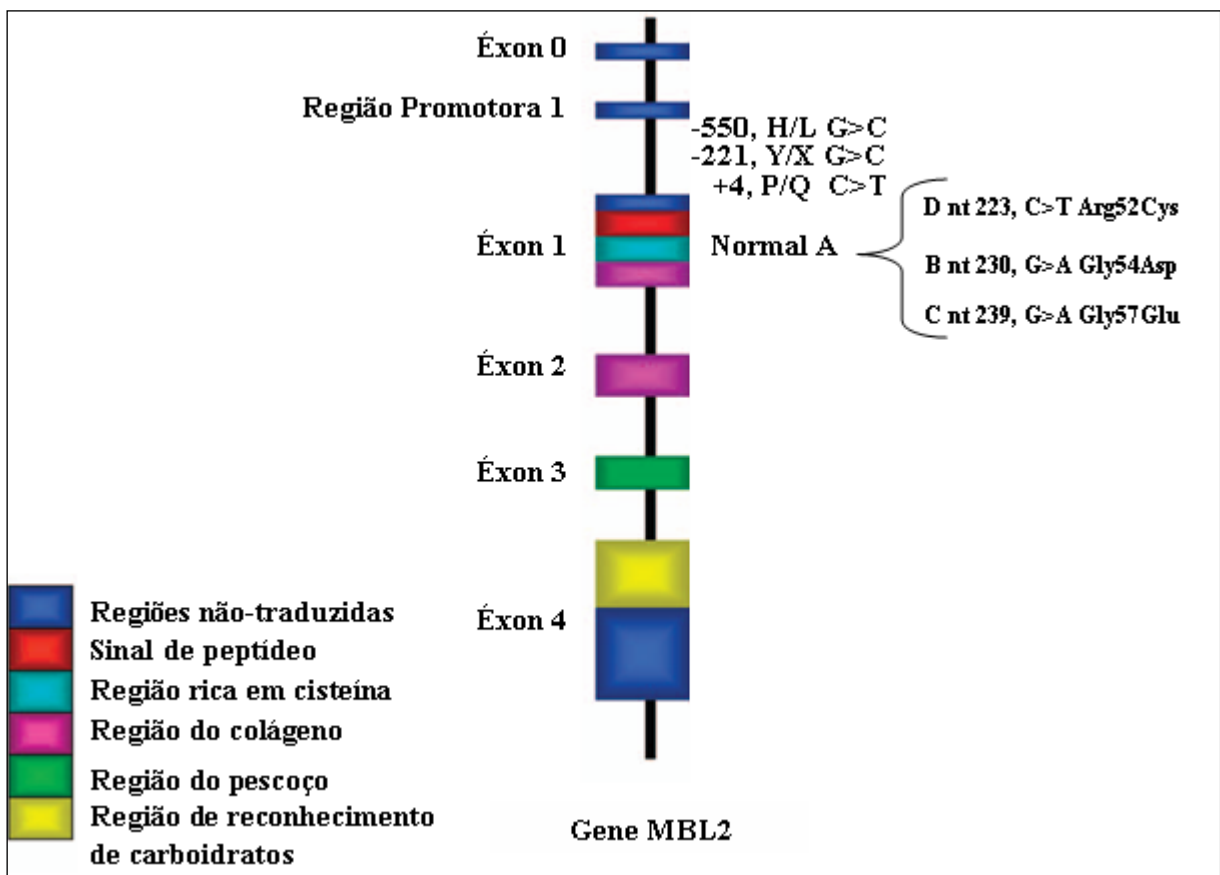


Figura 3: Características do gene *MBL2* (adaptado de DOMMETT; KLEIN; TURNNER, 2006).

Estudos comprovam que as variantes dos alelos B e C são independentes em distintas populações (LIPSCOMBE, et al, 1996). O alelo B foi encontrado em altas frequências na população europeia e norte-americana nativa, enquanto que o alelo C é mais encontrado na população do Saara (MADSEN et al, 1998). Altas frequências das variantes polimórficas são observadas em populações humanas de regiões tropicais (GARRED et al 1992).

Ip et al. (2000) realizaram estudos em pacientes chineses com AR e constataram que 67,8% apresentaram homozigose para o alelo A, 30,3% eram heterozigotos e 1,9% eram homozigotos para o polimorfismo no códon 54 (alelo B), indicando que existe uma relação entre o polimorfismo e a AR. Madsen et al (1998), encontraram frequências do alelo variante B superior a 42% em duas populações humanas sul-americanas nativas, 11% na população caucasiana e ausência em pacientes moçambicanos. Já para o alelo C, a frequência foi maior em moçambicanos (24%) e baixa em sul-americanos nativos e caucasianos (1% e 3% respectivamente). O alelo D foi observado somente na população caucasiana, sugerindo-se assim que diferentes populações são dominadas por diferentes haplótipos funcionais.

Geijn et al (2008) que realizaram estudo em mulheres caucasianas holandesas, assim como Grupta et al (2005) que realizaram estudos em indianos e Stanworth et al (1998) não encontraram relação entre a suscetibilidade em desenvolver AR e os polimorfismos do gene *MBL2*.

Outras doenças também podem estar envolvidas com o polimorfismo do gene *MBL2*, como por exemplo: Lupus Eritematoso Sistêmico (GARRED et al., 2001; HUANG et al., 2003), Síndrome de Sjögrens (WANG et al, 2001; CASALS et al 2009), Doença Celíaca (BONIOTTO et al., 2002; ILTANEN et al., 2003), Fibrose Cística (KILPATRICK, 2002), ou também pela diminuição dos níveis de MBL

plasmática como doenças infecciosas provocadas por vírus como a Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS), Hepatite B e C, influenza, Herpes simples; por bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli* e outras); por fungos (*Cândida albicans*, *Aspergillus fumigatus*) e também por protozoários (*Plasmodium falciparum*, *Trypanozoma cruzi*) (DOMMETT; KLEIN; TURNER, 2006; KILPATRICK, 2002).

Maury et al (2007) constataram que o genótipo variante do gene *MBL2* constitui um significativo risco genético para amiloidose em pacientes finlandeses com AR, demonstrando que o polimorfismo do gene *MBL2* está associado com a rápida progressão da erosão em AR.

Desta forma, julgou-se necessário a realização deste estudo para determinar se a relação entre o polimorfismo do gene *MBL2* e a AR existe na população brasileira e com que frequência ela ocorre, principalmente devido à grande variação étnica aqui existente.

1.2 Objetivos

- Analisar o polimorfismo gênico da região do éxon 1 do gene *MBL2* em pacientes com Artrite Reumatóide e comparar com um grupo controle constituído de indivíduos que se declararam saudáveis.
- Comparar a frequência alélica dos polimorfismos do gene *MBL2* entre as diferentes etnias dos pacientes com AR.

2 CAPÍTULO 2

Mannose-Binding Lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with Rheumatoid Arthritis

¹Fernanda Leticia Martiny, ²Tiago Degani Veit, ³Claiton Viegas Brenol, ³João Carlos Tavares Brenol, ³Ricardo Machado Xavier, ^{1,4*}Maurício Reis Bogo and ^{2*}José Artur Bogo Chies.

¹Genomics and Molecular Biology Laboratory, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre Brazil.

²Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

³Rheumatology Division, (University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil) Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

⁴National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding authors: Tel.: +55 51 3308-6740

E-mail addresses: mbogo@pucrs.br (M.R. Bogo) and jabchies@terra.com.br (J.A.B.Chies)

Abstract

Objective Rheumatoid Arthritis (RA) is a disease with unknown etiology but it is probably multifactorial. RA susceptibility is related to genetic, hormonal, immunological, and environmental factors. Mannose-Binding Lectin (MBL) is an important protein of the human innate immune system, and is encoded by the *MBL2* gene. Polymorphisms in *MBL2* were associated to several diseases, and may be an important factor in RA susceptibility. We analyzed three *MBL2* gene polymorphisms in 322 Brazilian patients with RA and 345 healthy controls ethnically matched.

Methods *MBL2* gene variants were analyzed through sequencing.

Results The frequency of the AA genotype was significantly lower among patients as compared to controls ($P = 0.044$ after Bonferroni correction). When considering *MBL2* B, C and D alleles isolated, a significant difference in both genotypic and allelic frequencies, particularly concerning the frequency of the C allele, was observed comparing European-derived and African-derived individuals (European-derived patients: 0.022 vs. African-derived patients: 0.205; European-derived controls: 0.029 vs. African-derived controls 0.144, both $P < 0.001$). We also analyzed *MBL2* genotype in relation to extra-articular manifestations. When considering *MBL2* variants together we found an increased frequency of the OO genotype among patients with rheumatoid nodules ($P = 0.031$), although this association lost significance after Bonferroni correction.

Conclusion This finding suggests an association of *MBL2* genotypes and disease susceptibility and severity, but more studies are needed to clarify the actual role of MBL in RA.

Key Indexing Terms: Mannose-Binding Lectin, Rheumatoid Arthritis, Genetics and Immunology.

Introduction

The etiology of Rheumatoid Arthritis (RA) is unknown, but it is probably related to genetic, immunological, and environmental factors. Considering its genetic component, a combination of genes, instead of a single gene, predisposes to an immunological disorder that leads to defective mechanisms of immunological tolerance, causing autoantibody production and leading to immune complex formation and deposition.

Since Mannose-binding lectin (MBL) is an important protein of the human innate immune system, it is possible to hypothesize that this molecule is linked to RA susceptibility. MBL acts as an activator of the complement system through the lectin pathway, inducing opsonization of microorganisms and phagocytosis of apoptotic cells by macrophages. Three functional single-nucleotide polymorphisms (SNPs) have been described in codons 54 (allele B), 57 (allele C) and 52 (allele D) and were associated to changes in the structure and functional deficiency of this protein. In codon 54, an A to G substitution alters an aspartic acid to a glycine at protein level. In codon 57 there is a G to A substitution (glycine to glutamic acid), and in codon 52 a C to T substitution leads to a change from arginine to cysteine. Altogether, the presence of any of the variant alleles has been collectively labeled O, whereas the simultaneous absence of variants at the three positions has been called allele A, the wild-type allele.

In the present study, we analyzed *MBL2* polymorphisms in RA patients and healthy individuals of different ethnic origins. We also evaluated different clinical symptoms in order to identify possible associations between the *MBL2* polymorphic variants and RA.

Materials and methods

The RA patient group was composed by 322 patients. Of these, 300 patients were identified as European-derived and 22 patients as African-derived individuals. This classification was based on physical appearance and on data about the ethnicity of parents/grandparents reported by the participants, a classification criteria supported by recent studies using a 48-insertion-deletion Ancestry-Informative Marker panel (1). The patients received follow-up care at the Division of Rheumatology of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), meeting the American College of Rheumatology criteria. The disease activity score (DAS28) and the health assessment questionnaire (HAQ) were applied to each patient as a measure of disease activity and physical ability and clinical manifestations were evaluated. The control group was formed by 345 individuals from the urban population of Porto Alegre, the same geographic area of the patients. Genotyping was performed using PCR amplification as previously described (2) and the amplified fragments were sequenced using MEGABACE 1000 (*Amersham Biosciences*). The chromatograms were observed using the FinchTV Version 1.4.0 software. This study protocol was approved by the Ethics Committee of the HCPA and informed consent was obtained from all patients.

Statistical analysis

The genotypic frequencies were compared using Hardy-Weinberg (HW). Independency tests between patients and controls group was performed using chi-squared test or Fisher's exact test. For the comparison of clinical and laboratory variables with the frequencies of polymorphic variants, we used the chi-square test to compare qualitative variables and the Student's t-test (or Mann-Whitney) for quantitative variables. Bonferroni correction for multiple comparisons was applied in order to confirm whether the P values were significant. Mean DAS28 and HAQ

values were analyzed using one-way ANOVA and Kruskal–Wallis test, respectively. The significance level was set at $\alpha = 0.05$ (two tailed) and all statistical analyses were performed with SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) and WINPEPI.

Results and Discussion

This study analyzed a possible genetic association between *MBL2* polymorphisms and susceptibility to RA as well as clinical features of this disease in Brazilian patients. Table 1 summarizes the frequencies of clinical and laboratory features on patients.

The frequencies of *MBL2* gene polymorphisms were studied in patients with RA and healthy controls. All groups were on HW equilibrium. When alleles B, C and D were considered together as allele O (since all different alleles result in the same phenotype, i.e. reduced MBL function), no differences were observed between the groups classified by ethnic origin and therefore we grouped all patients. In this analysis, the frequency of the AA genotype was significantly lower among patients as compared to controls ($P = 0.044$ after Bonferroni correction). (Table 2). Nevertheless, when we compared the allelic and genotypic frequencies between European-derived and African-derived patients, considering the *MBL2* A, B and C variants isolated, significant differences were observed due to the high frequency of allele C among the African-derived patients. Madsen et al (3) and Garred et al (4) showed the same high frequency of allele C in African-derived patients with RA. Therefore, this last result in fact reflects the differences among ethnic origin rather than individual differences due to RA *per se*.

We analyzed the *MBL2* variants in relation to clinical and laboratory features as well as considering disease severity measured by DAS28 and HAQ. No significant differences were observed when alleles were analyzed individually, suggesting that these polymorphisms are not related to the disease pathophysiology. When

considering homozygous OO individuals, female patients presented lower, although not statistically significant, DAS28 means (genotype AA or AO= 4.11 ± 1.28 (n=203) and genotype OO= 3.49 ± 1.16 (n=11), $P=0.10$) and HAQ means (AA or AO genotype = 1.31 ± 0.76 and OO genotype = 0.86 ± 0.62 , $P=0.06$) as compared to controls.

Several studies showed that *MBL2* gene polymorphisms can be associated with clinical and laboratory features in different situations such as cardiovascular diseases, proinflammatory conditions and autoimmune diseases such as SLE (2,5,6). Specifically concerning RA, different clinical features were associated with polymorphic variants of the *MBL2* gene in different populations (Table 3). We analyzed the *MBL2* genotype in relation to extra-articular manifestations. Considering the alleles individually, no significant differences were observed. When considering *MBL2* variants together, however, an increased frequency of the OO genotype was observed in patients with rheumatoid nodules [AA or AO genotype = 96.0 (n=240) and OO genotype = 4.0 (n=10) $P=0.031$], although this association lost significance after Bonferroni correction.

In the present study, the frequency of the AA genotype was significantly lower among patients as compared to controls. A significant difference between European-derived and African-derived patients was observed, considering the C allele, reflecting a higher prevalence of this allele among African-derived subjects. Moreover, a tendency was observed suggesting a possible association of homozygous OO individuals with rheumatoid nodules. These findings suggest an association of the *MBL2* gene and disease susceptibility and severity. However, more studies are needed to clarify the true role of *MBL2* in RA.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

1. Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat* 2010;31:184-190.
2. Monticielo OA, Chies JA, Mucenic T, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphisms in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2010 3:280-287.
3. Garred P, Larsen F, Madsen HO, et al. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. *Mol Immun* 2003;40:73-84.
4. Garred P, Larsen F, Seyfarth J, et al. Mannose-Binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun* 2006;7:85-94.
5. Schafranski MD, Ferrari LP, Scherner D, et al. High-producing *MBL2* genotypes increase the risk of acute and chronic carditis in patients with history of rheumatic fever. *Mol Immun* 2008;45:3827-3831.
6. Alves Pedroso ML, Boldt AB, Pereira-Ferrari L, et al. Mannan-binding lectin *MBL2* gene polymorphism in chronic hepatitis C: association with the severity of liver fibrosis and response to interferon therapy. *Clin Exp Immun* 2008;152:258-264.

7. Graudal NA, Madsen HO, Tarp U, et al. The association of variant mannose-binding lectin genotypes with radiographic outcome in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:515-521.
8. Jacobsen S, Madsen HO, Klarlund M, et al. The influence of mannose binding lectin polymorphisms on disease outcome in early polyarthritis. TIRA Group. *J Rheumatol* 2001;28:935-942.
9. Maury CPJ, Aittoniemi J, Tiitinen S, et al. Variant mannose-binding lectin 2 genotype is a risk factor for reactive systemic amyloidosis in rheumatoid arthritis. *J. Internal Medicine* 2007;262:466-469.
10. Troelsen LN, Garred P, Christiansen B, et al. Double role of mannose-binding lectin in relation to carotid intima-media thickness in patients with rheumatoid arthritis. *Mol Immun* 2010;47:713-718.
11. Troelsen LN, Garred O, Madsen HO, et al. Genetically Determined High Serum Levels of Mannose-Binding Lectin and Agalactosyl IgG Are Associated With Ischemic Heart Disease in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2007;56:21-29.
12. Ip WK, Lau YL, Chan SY, et al. Mannose-binding lectin and rheumatoid arthritis in southern chinese. *Arthritis & Rheumatism* 2000;43:1679-1687.
13. Tsutsumi A, Sasaki K, Wakamiya N, et al. Mannose-binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. *Genes and Immunity* 2001;2:99-104.

14. Geijn FE van, Hazes JMW, Geleijns K, et al. Mannose-binding lectin polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis-confirmation in two large cohorts. *Rheumat* 2008;47:1168-1171.

15. Gupta B, Agrawal C, Raghav SK, et al. Association of mannose-binding lectin gene (*MBL2*) polymorphisms with rheumatoid arthritis in an Indian cohort of case-control samples. *J Hum Genet* 2005;50:583-591.

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

Patients' features	n (322)	%	Means	DP
Females	259	80.4		
European-derived	300	93.2		
African-derived	22	6.8		
Age (years)			60.5	12.3
Age at diagnosis (years)			45.6	13.6
DAS means			3.9	1.3
HAQ means			1.25	0.89
RF positivity	270	83.9		
Erosions	281	87.3		
EA manifestations	84	26.1		
Rheumatoid nodules	65	20.7		
Vasculitic	8	2.5		
Felty	1	0.3		
Amyloidosis	3	1		
Episcleritis	11	3.5		
Pneumonitis	3	1		
Pericarditis	0	0		
Subluxations	32	10.2		

Table 2 MBL genotypic frequency in RA patients and healthy controls

Genotype	European-derived		African-derived		Patients	Controls
(considering only A and O alleles)						
	Patients	Controls	Patients	Controls		
	n=300	n=244	n=22	n=101	n=322	n=123
AA	160 (0.53)	148 (0.61)	11 (0.50)	59 (0.58)		
AO	123 (0.41)	83 (0.34)	8 (0.36)	37(0.37)		
OO	17 (0.06)	13 (0.05)	3 (0.14)	5 (0.05)		
P-value ^a	0.22		0.30		0.044	
Allele						
	n= 600	n= 488	n= 44	n= 202		
A	443 (0.74)	379 (0.78)	30 (0.68)	155 (0.77)		
B	112 (0.19)	79 (0.16)	5 (0.11)	13 (0.06)		
C	13 (0.02)	14 (0.03)	9 (0.20)	29 (0.14)		
D	32 (0.05)	16 (0.03)	0 (0.00)	5 (0.02)		
P-value ^a	0.20		0.34			
Genotype (considering A, B, C and D alleles)						
	n=300	n=244	n=22	n=101		
AA	160 (0.53)	148 (0.61)	11 (0.50)	59 (0.58)		
AB	91 (0.30)	60 (0.25)	4 (0.18)	10 (0.10)		
AC	8 (0.03)	9 (0.04)	4 (0.18)	22 (0.22)		
AD	24 (0.08)	14 (0.06)	0 (0.00)	5 (0.05)		
BB	7 (0.02)	6 (0.02)	0 (0.00)	1 (0.01)		

BC	3 (0.01)	5 (0.02)	1 (0.05)	1 (0.01)
BD	4 (0.01)	2 (0.01)	0 (0.00)	0 (0.00)
CC	1 (0.00)	0 (0.00)	2 (0.09)	3 (0.03)
DD	2 (0.01)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
P-value ^a	0.41		0.37	

Abbreviations: A: wild type allele; O: allele B or C or D.

^a Chi-square test.

Table 3: Characteristics of the studies on the *MBL2* gene and RA.

Population	Alleles/Genotypes studied	Clinical Features	Reference
Danish Caucasian	AA, AO and OO	Joint destruction	7
Danish	AA, AO and OO	Early erosive	8
Finnish	AA, AO and OO	Systemic amyloidosis	9
Danish	AA, AO and OO	Atherosclerosis and cardiovascular disease	10, 11
Southern Chinese	Allele B	Associated to RA	12
Japanese	Allele B	Associated to autoimmune disorders	13
Dutch Caucasians	AA, AO and OO	Not associated to RA	14
Indian	Allele B	Protection against RA	15

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo avaliou o polimorfismo no gene *MBL2* em pacientes com artrite reumatóide comparando-os com indivíduos saudáveis. Este polimorfismo causa mudanças estruturais na molécula MBL, promovendo a diminuição de seus níveis séricos e conseqüente aumento da suscetibilidade a doenças auto-imunes, como a AR. A variação da concentração da molécula de MBL pode trazer tanto benefícios como malefícios ao indivíduo. Por exemplo, altos níveis séricos de MBL podem proteger o indivíduo contra infecções, mas ao mesmo tempo podem facilitar a entrada de micro-organismos como a *Leishmania* e outros parasitas para dentro das células. Entretanto, baixos níveis podem estar envolvidos na proteção contra estas infecções (DOMMETT et al, 2006).

Neste trabalho encontramos uma frequência genotípica e alélica significativamente diferente quando comparamos pacientes euro-descendentes e africanos-descendentes e indivíduos controles euro-descendentes e africanos-descendentes, principalmente no que se refere a presença do alelo C em africanos-descendentes. Esta diferença reflete as heterogeneidades étnicas existentes e não uma relação com a AR. Outro ponto relevante foi a relação da frequência genotípica (OO) e a presença de nódulos reumatoides. Estes resultados sugerem uma associação do gene *MBL2* e susceptibilidade à doença e sua gravidade. Entretanto, mais estudos são necessários para esclarecer o verdadeiro papel da *MBL2* na AR.

REFERÊNCIAS

ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A.. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews** 4, (2005), p.130–136.

American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines: Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** 46, (2002), p.328-46.

ANDERSON, K. O.; et al. Rheumatoid arthritis: review of psychological factors related to etiology, effects, and treatment. **Psychol Bulletin** 98, (1985), nº 2, p.358-357.

ARNETT, F. C.; EDWORTHY, S. M.; BLOCH, D. A. et al.: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum** 31, (1988), p.315-324.

ARNOLD, J. N. Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease. **Immun Letters** 106, (2006), p.103–110.

BÉRTOLO, M. B. Atualização do Consenso Brasileiro no Diagnóstico e Tratamento da Artrite Reumatóide. **Rev Bras Reumatol** 47, (2007) nº3, p.151-159.

BONIOTTO, M. et al. Variant mannose-binding lectin alleles are associates with celiac disease. **Immunogenetics** 54 (2002) nº8, p.596-598.

CASALS, M. R. et al. Mannose-binding lectin-low genotypes are associated with milder systemic and immunological disease expression in primary Sjögren's syndrome. **Rheumat** 48 (2009), p.65–69.

DOMMETT, R. M.; KLEIN, N.; TURNER, M. W.. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. **J Compilation** 68, (2006), p.193–209.

GABRIEL, S. E.. The epidemiology of rheumatoid arthritis. **Rheumatic disease clinics of North America** 27, (2001), n°2, p.269-291.

GARRED, P. et al. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. **Mol Immun** 40, (2003), p.73–84.

GARRED, P. et al. Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a populationbased cohort of systemic lupus erythematosus patients. **Genes and Immunity** 2 (2001), p.442–450.

GARRED, P. et al. Diallelic polymorphism may explain variations of the blood concentration of mannan-binding protein im Eskimos, but not in black Africans. **Eur J Immunogen** 19, (1992), p.403-412.

GEIJN, F. E. van de et al. Mannose-binding lectin polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis-confirmation in two large cohorts. **Rheumat** 47 (2008), p.1168–1171.

GUPTA, B. et al Anti-MBL autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis: prevalence and clinical significance. **J of Autoimmunity** 27, (2006), p.125-133.

GUPTA, B. et al. Association of mannose-binding lectin gene (*MBL2*) polymorphisms with rheumatoid arthritis in an Indian cohort of case-control samples. **J Hum Genet** 50, (2005), p.583–591.

HUANG, Y. F. et al. Increased frequency of the mannose-binding lectin LX haplotype in Chinese systemic lupus erythematosus patients. **Eur J of Immunogenetics** 30 (2003) p.121-124.

ILTANEN, S. et al. The association between mannan-binding lectin gene alleles and celiac disease. **The American J of Gastroent** 98 (2003), p.2808-2809.

IP, W. K. Mannose-binding lectin and rheumatoid arthritis in southern chinese. **Arthritis & Rheumatism** 43 (2000), n°8, p.1679–1687.

KILPATRICK, D.C.. Therapeutic Applications of Mannan-Binding Lectin. **Biochemical Society Transactions** 31, (2003), p.745-747.

KILPATRICK, D.C.. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. **Biochimica et Biophysica Acta** 1572 (2002), p.401– 413.

KORB, A.; PAVENSTADT, H.; PAP, T.. Cell death in rheumatoid arthritis. **Apoptosis** (2009).

LAURINDO I. E. M., PINHEIRO G. R. C., XIMENES A. C., et al: Consenso brasileiro para o diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. **Rev Bras Reumatol** 42, (2002), p.355-361.

LEE, D. M.; WEINBLATT, M. E.. Rheumatoid arthritis: review. **The Lancet** 358, (2001), p.903-911.

LIPSCOMBE, R. J. et al. Mutations in the human mannan-binding protein gene: frequencies in several population groups. **Eur J Hum Genet** 4, (1996), p.13-19.

LOUZADA, P. J.. Análise Descritiva das Características Demográficas e Clínicas de Pacientes com Artrite Reumatóide no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Bras Reumatol** 47, (2007) nº 2, p.84-90.

MADSEN, H.O. et al. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from Southeast Africa and South America. **J Immunol** 161, (1998), p.3169-3175.

MADSEN, H.O. et al. Interplay between promoter-and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. **J Immunol** 155, (1995), p.3013–3020.

MADSEN, H.O. et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. **Immunogenetics** 40, (1994), p.37-44.

MAURY, C. P. J. et al. Variant mannose-binding lectin 2 genotype is a risk factor for reactive systemic amyloidosis in rheumatoid arthritis. **J Internal Med** 262 (2007), p.466-469.

PAN, S. M.; GABAY, C.; FINCKH, A.. A systematic review of infliximab in the treatment of early rheumatoid arthritis. **Therapeutics and Clinical Risk Management** 3(2007) n°5, p.905–911.

SILMAN, A. J.; PERSON, J. E.. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis: supplement review. **Arthritis Res** 4, (2002), p.S265-S272.

STANWORTH, S. J. et al. Absence of an association between mannose-binding lectin polymorphism and rheumatoid arthritis. **British J of Rheum** 37 (1998), p.186–188.

TAVARES, L. N.; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W. H.; Elementos básicos de diagnóstico da doença (artrite) reumatóide. **Rev Temas de Reumatologia Clínica** (2000).

TORIGOE, D. Y.; LAURINDO, I. M. M.. Artrite Reumatóide e Doenças Cardiovasculares. **Rev Bras Reumatol** 46, (2006), p.60-66.

TURNER, M. W.. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Mol Immun** 40, (2003), p.423–429.

TURNER, M. W.. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immun Today** 17, (1996), n°11, p.532-540.

YOUNG, A. et al. Which patients stop working because of rheumatoid arthritis? Results of five years' follow up in 732 patients from the Early RA Study (ERAS). **Ann Rheum Dis**, 61, (2002), p.335–340.

WALPORT, M. J. Complement. **The New England J of Med** 344, (2001) n°14, p.1058-1066.

WANG, Z. Y. et al. Polymorphisms of the mannose binding lectin gene in patients with Sjögren's syndrome. **Ann Rheum** 60 (2001), p.483–486.

ANEXO

Submission Confirmation – The Journal of Rheumatology