NATALIA UMETSU SOBRINHO

**Caracterização molecular dos componentes C1q, C4
e C2 do sistema complemento em pacientes
pediátricos com lúpus eritematoso sistêmico**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Programa de Pediatria
Orientadora: Dra. Bernadete de Lourdes Liphaus**

São Paulo

2013

NATALIA UMETSU SOBRINHO

**Caracterização molecular dos componentes C1q, C4
e C2 do sistema complemento em pacientes
pediátricos com lúpus eritematoso sistêmico**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Programa de Pediatria
Orientadora: Dra. Bernadete de Lourdes Liphaut**

(Versão Corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Umetsu Sobrinho, Natalia

Caracterização molecular dos componentes C1q, C4 e C2 do sistema complemento em pacientes pediátricos com lúpus eritematoso sistêmico / Natalia Umetsu Sobrinho. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Pediatria.

Orientador: Bernadete de Lourdes Liphaut.

Descritores: 1.Lúpus eritematoso sistêmico 2.Complemento C1q/deficiência 3.Complemento C4/deficiência 4.Complemento C2/deficiência 5.Mutação 6.Genes 7.Criança 8.Adolescente

USP/FM/DBD-190/13

DEDICATÓRIA

*Ao meu tio Toshio que nos deixou repentinamente. As
lembranças dos momentos tão alegres ao seu lado
estarão sempre presentes nos meus pensamentos e jamais
serão esquecidos. Saudades...*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Bernadete Liphaus pela importante orientação e apoio na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Magda Carneiro-Sampaio pela oportunidade de realização deste trabalho, pela confiança e pelo apoio em todos os momentos.

À Silvia Bando por todos os ensinamentos laboratoriais, acadêmicos, companheirismo e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Clovis Arthur Almeida da Silva, a Dra. Adriana Almeida de Jesus e aos médicos da unidade de Reumatologia do Instituto da Criança pela valiosa ajuda com os pacientes da unidade.

Aos pacientes deficientes de complemento e suas famílias.

A minha tia Mariza por sempre estar presente e a constante ajuda em todos os momentos.

A minha mãe, irmã e todos os meus familiares que sempre me apoiaram nas minhas decisões e por estarem sempre presentes em todos os momentos importantes da minha vida.

Ao Dr. Luis Eduardo Coelho Andrade pela ajuda com a quantificação de C1q.

À Leuridan Torres pela inicial ajuda nesse trabalho, pelos ensinamentos e pela amizade.

À Profa. Dra. Sandra Grisi e Dra. Ana Maria Escobar pelo importante incentivo para iniciar a vida acadêmica.

Ao Dr. Alexandre Ferraro pela ajuda estatística.

À minha amiga Thais Stefane pela amizade de muitos anos.

À Thais Scudelletti e Mariana Ambrosio, pela amizade e por sempre estarem ao meu lado com palavras positivas durante todos os momentos desse trabalho.

Aos colegas do LIM-36 pelo companheirismo e apoio em todos os momentos.

As secretárias do Departamento de Pediatria Rosangela Souza Mônica, Souza e Adriana Bezerra pelo auxílio em todos os momentos.

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. Introdução.....	2
2. Objetivos.....	9
3. Métodos.....	11
3.1. Pacientes e Controles.....	11
3.2. Extração de DNA	12
3.3. Desenho dos iniciadores para caracterização molecular dos genes C1q e C2.....	13
3.4. Sequenciamento dos genes C1q e C2.....	15
3.5. Detecção da deficiência de C2 do tipo I.....	16
3.6. Desenho dos iniciadores para análise de expressão de mRNA do gene C4.....	17
3.7. Análise da expressão de mRNA de C1q, C4 e C2.....	18
3.7.1. Análise qualitativa.....	19

3.7.2. Análise quantitativa.....	20
3.8. Quantificação de C1q no sobrenadante da cultura.....	21
4. Resultados.....	23
4.1. Caracterização molecular da deficiência de C1q.....	24
4.2. Análise qualitativa da expressão de mRNA de C1q.....	30
4.3. Análise quantitativa da expressão de mRNA de C1q.....	33
4.4. Quantificação de C1q no sobrenadante da cultura.....	33
4.5. Caracterização molecular da deficiência de C2.....	37
4.6. Análise qualitativa da expressão de mRNA de C2.....	39
4.7. Análise quantitativa da expressão de mRNA de C2.....	40
4.8. Caracterização molecular da deficiência de C4.....	42
5. Discussão.....	45
6. Conclusões.....	51
7. Referência.....	53
Anexos	

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática da proteína C1q	5
Figura 2 - Representação da estratégia para desenho dos iniciadores dos genes C1qA, B, C e C2.....	13
Figura 3 - Sequenciamento do gene C1qA exon 3 da paciente P1.....	25
Figura 4 - Sequenciamento do gene C1qB exon 1 da paciente P1.....	25
Figura 5 - Sequenciamento do gene C1qB exon 3 da paciente P1.....	26
Figura 6 - Sequenciamento do gene C1qC exon 2 da paciente P1.....	26
Figura 7 - Sequenciamento do gene C1qA exon 3 da mãe da paciente P1.....	28
Figura 8 - Sequenciamento da região 5'UTR do gene C1qB da mãe da paciente P1.....	29
Figura 9 - Sequenciamento da região 3'UTR do gene C1qB da mãe da paciente P1.....	29
Figura 10 - Sequenciamento do gene de C1qC exon 2 da mãe da paciente P1.....	30

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5%. RT-PCR da expressão de mRNA do gene C1q e controle endógeno GAPDH de células mononucleadas da paciente P1.....	11
Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5%. RT-PCR da expressão de mRNA do gene C1q das células mononucleadas da mãe da paciente P1.....	32
Figura 13 - Valores da variação relativa de expressão (VRE) de mRNA do C1qA nos controles e na paciente P1 com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).....	34
Figura 14 - Valores da variação relativa de expressão (VRE) de mRNA do C1qB nos controles e na paciente P1 com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).....	35
Figura 15 - Valores da variação relativa de expressão (VRE) de mRNA do C1qC nos controles e na paciente P1 com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).....	36
Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose a 2,0%. PCR das pacientes P2 e P3.....	37
Figura 17 - Cromatograma do sequenciamento do gene de C2 da paciente P2.....	38

Figura 18 - Cromatograma do sequenciamento do exon 6
do gene C2 (deleção 28pb) das pacientes P2 e P3.....39

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%. RT-PCR
da expressão de mRNA do gene C2 e GAPDH das
células mononucleadas da paciente P3.....40

Figura 20 - Valores da variação relativa de expressão (VRE)
de mRNA do C2 nos controles e na paciente P3
com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).....41

Figura 21 - Valores da variação relativa de expressão (VRE)
de mRNA do gene C4B nos controles e na paciente
P4 com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).....43

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Parâmetros utilizados na caracterização das pacientes lúpicos com deficiência primária de complemento.....	12
Tabela 2 - Relação dos iniciadores confeccionados para amplificação do gene C1q.....	14
Tabela 3 - Relação dos iniciadores confeccionados para amplificação do gene C2.....	15
Tabela 4 - Relação dos iniciadores confeccionados para amplificação do gene C4.....	17
Tabela 5 - Características clínicas, laboratoriais e evolução clínica das pacientes com lúpus eritematoso sistêmico selecionados para o estudo.....	23
Tabela 6 – Valores da variação relativa de expressão (VRE) de mRNA do C1qA nos controles e na paciente P1 com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).....	34
Tabela 7 – Valores da variação relativa de expressão (VRE) de mRNA do C1qB nos controles e na paciente P1 com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).....	35

Tabela 8 – Valores da variação relativa de expressão (VRE)
de mRNA do C1qC nos controles e na paciente P1
com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).....36

Tabela 9 – Valores da variação relativa de expressão (VRE)
de mRNA do C2 nos controles e na paciente P3
com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).....41

Tabela 10 – Valores da variação relativa de expressão (VRE)
de mRNA do C4B nos controles e na paciente P4
com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).....43

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

LES	Lúpus eritematoso sistêmico
ACR	Colégio Americano de Reumatologia
SC	Sistema Complemento
VRE	Variação relativa de expressão
SLEDAI-2K	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima
UTR	Região não traduzida
PCR	Reação em cadeia da polimerase
mRNA	RNA mensageiro
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
IFN-γ	Interferon gama
P	Paciente
min	Minutos
s	Segundos

Umetsu Sobrinho N. *Caracterização molecular dos componentes C1q, C4 e C2 do sistema complemento em pacientes pediátricos com lúpus eritematoso sistêmico* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2013.

Objetivo: Realizar a caracterização molecular dos genes C1q, C4 e C2 em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ). **Métodos:** Quatro pacientes com LESJ e deficiências de C1q, C4 e/ou C2 foram selecionados. O paciente P1 apresentava níveis séricos indetectáveis de C1q e níveis normais de C3 e C4; paciente P2 níveis baixos de C2 e C4 no soro; P3 apresentava níveis baixos de C2 e normais de C3 e C4 e P4 constantes níveis baixos de C4 e níveis normais de C1q, C2 e C3 no soro. Foram sequenciados os genes C1q e C2. Células mononucleares dos pacientes P1, P3 e P4 e de três indivíduos saudáveis foram cultivadas, estimuladas com interferon gama e incubadas por 36 horas e PCR quantitativo (qRT-PCR) foi realizado para verificar a expressão de mRNA. **Resultados:** A caracterização molecular do gene C1q (P1) mostrou trocas heterozigotas na cadeia A (c.276 A>G Gly) e na cadeia C (c.126 C>T Pro). Foram observadas também duas trocas de base em homozigose na região 5'UTR (c. -159 T>G) e na região 3'UTR (c*78 A>G) da cadeia B. O qRT-PCR mostrou que a expressão de mRNA de C1qA no paciente P1 sem estímulo estava 1,3 vezes mais baixo e com estímulo de interferon gama estava 1,6 vezes mais expresso se comparado aos indivíduos saudáveis. A expressão de mRNA de C1qB sem estímulo foi 2,2 vezes mais baixo e com estímulo foi 1,5 vezes mais expresso quando comparados aos controles. Para C1qC os indivíduos controles não expressaram mRNA porém o paciente P1 apresentou pequena expressão com e sem estímulo. O sequenciamento do gene C2 dos pacientes P2 e P3 apresentou 100% de similaridade com a sequência de referência com exceção da deleção de 28pb no exon 6 (deficiência

heterozigota de C2 do tipo I). A expressão de mRNA de C2 do paciente P3 foi sem estímulo 23 vezes mais baixo e com interferon 4,2 vezes menos expresso quando comparado aos controles. P4 apresentou 2 cópias de C4A e 3 cópias de C4B e no qRT-PCR o gene C4B estava 14 vezes menos expresso sem estímulo e com estímulo estava semelhante aos controles.

Conclusões: As trocas de base em homozigose nas regiões 5'UTR (região promotora) e 3'UTR (região de estabilização do mRNA) na cadeia B do gene C1q podem ter modificado a região de transcrição do mRNA pois sua expressão sem estímulo foi baixa. Outras investigações são necessárias para relacionar as variações do gene C1q encontradas com os níveis séricos indetectáveis de C1q. A deficiência de C2 do tipo I heterozigota pode levar a redução na expressão de mRNA e pode estar presente em pacientes lúpicos com níveis séricos detectáveis de C2. Por fim, a baixa expressão de mRNA de C4B mostrou que as dosagens séricas e a avaliação do número de cópias podem não ser suficientes para estabelecer a deficiência de C4.

Descritores: 1.Lúpus eritematoso sistêmico 2.Complemento C1q/deficiência 3.Complemento C4/deficiência 4.Complemento C2/deficiência 5.Mutação 6.Genes 7.Criança 8.Adolescente

Umetsu Sobrinho N. *Molecular characterization of complement components C1q, C4, and C2 in pediatric patients with Systemic Lupus Erythematosus* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Objective: To perform the molecular characterization of C1q, C4 and C2 genes in patients with Juvenile Systemic Lupus Erythematosus (JSLE).

Methods: Four patients with JSLE and C1q, C4 and/or C2 deficiencies were chosen. Patient P1 had undetectable C1q serum level and normal levels of C3 and C4; Patient P2 had decreased levels of C2 and C4 serum while P3 had decreased C2 with normal C3 and C4 levels. Lastly P4 had repeated decreased C4 and normal C1q, C2 and C3 serum levels. C1q and C2 genes were sequenced. Peripheral mononuclear cells from patients P1, P3 and P4 and from three healthy individuals were both cultivated and stimulated with interferon gamma and a quantitative PCR (qRT-PCR) was also performed to verify mRNA expression. **Results:**

C1q molecular characterization for P1 revealed heterozygous silent mutations in A chain (c.276 A>G Gly) and in C chain (c.126 C>T Pro). Additionally, in B chain two homozygous single-base exchanges were detected in the 5'UTR (c. -159 T>G) and 3'UTR region (c*78 A>G). The qRT-PCR revealed that C1qA gene mRNA expression without stimulation was decreased 1.3 times and with interferon gamma was 1.6 times more expressed compared with controls samples. C1qB gene expression without stimulation was 2.2 times decreased and when stimulated was 1.5 times more expressed. Controls did not expressed C1qC gene and patient P1 had low expression both with and without stimulation. P2 had 2 copies of C4A and 1 copy of C4B. C2 gene sequencing (P2 and P3) showed 100% match with referenced sequence, with exception to 28bp deletion at the exon 6 (heterozygous C2 deficiency type I). C2 mRNA expression from P3 without stimulation was 23 times decreased and with interferon was 4.2 times decreased compared with controls. P4 had 2 copies of C4A and 3 copies of

C4B. The qRT-PCR were performed only in C4B gene showed without stimulation a 14 times decreased expression and with interferon stimulation the expression were similar to controls. **Conclusions:** The two homozygous single-base exchanges in 5'UTR and 3'UTR that correspond to the promoter region and stabilization mRNA region in B chain of C1q gene, may have modified mRNA transcription as its expression was decreased without stimulation. Further analysis is necessary to relate C1q gene variations and undetectable serum C1q. In addition, heterozygous C2 deficiency type I may lead to reduced mRNA expression and may be present in JSLE patients with detectable C2 levels. Finally, the decreased C4B gene expression showed that serum dosage and gene copy number may not be sufficient to assess C4 deficiency.

Descriptors: 1.Lupus erythematosus, systemic 2.Complement C1q/deficiency 3.Complement C4/deficiency 4.Complement C2/deficiency 5.Mutation 6.Genes 7.Child 8.Adolescent

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é a mais heterogênea dentre as doenças autoimunes e se caracteriza pela quebra da tolerância imune com produção de auto-anticorpos que se depositam em múltiplos órgãos e tecidos [1,2]. O LES ocorre devido a interação de diversos fatores ambientais, imunológicos e genéticos [1,2]. O fumo e a exposição à luz ultravioleta são apontadas como desencadeantes do LES em estudos populacionais [3,4]. Além disso, falhas na depuração de autoantígenos durante o processo de apoptose, perda de tolerância imune, com ativação policlonal de linfócitos B, produção de autoanticorpos e falha nos mecanismos de regulação imune contribuem para o desenvolvimento do LES [5,6]. Recentemente um estudo identificou alguns loci (TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 e IL10) como de risco para o LES [7]. Os loci identificados até agora são responsáveis por aproximadamente 15% da herdabilidade do LES [8]. O número de cópias de certos genes como o C4, FCGR3B e TLR7 têm sido relacionados com o aparecimento da doença [9,10,11].

Por se tratar de uma doença complexa, as manifestações clínicas do LES são bastante variáveis. Alguns pacientes apresentam eritema malar, febre, artrite e remissão espontânea, outros no entanto, apresentam doença grave e progressiva, com envolvimento renal e de sistema nervoso central [12]. Qualquer sinal ou sintoma pode ser a primeira e única manifestação da doença e pode persistir ou recorrer por meses ou anos até o diagnóstico de LES ser confirmado pela presença de outros acometimentos [13]. O diagnóstico de LES

é estabelecido quando o paciente apresenta quatro ou mais sinais ou sintomas de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) [14,15]. O LES acomete geralmente mulheres entre 15 e 50 anos [13].

O Sistema complemento (SC) está envolvido na rápida resposta a patógenos invasores e na depuração de imunocomplexos e células apoptóticas [16,17]. Recentemente tornou-se evidente que o SC também tem importante papel na imunidade adaptativa que envolve células T e B e auxilia na eliminação de patógenos e na manutenção da memória imunológica prevenindo contra possíveis reinfecções [18,19]. O SC também está envolvido na regeneração celular, no crescimento de tumores e em algumas doenças como a síndrome hemolítica urêmica atípica e a degeneração macular relacionada à idade [20].

O SC é composto por mais de 30 proteínas que estão presentes no plasma e na superfície de membranas celulares, que são ativadas em cascata por meio de quebras proteolíticas [21]. O SC pode ser iniciado por três diferentes vias, a clássica, a das lectinas e a alternativa. A via clássica é iniciada quando imunocomplexos são formados depois da ligação de IgG ou IgM a patógenos, anticorpos ligados a antígenos próprios e não próprios e a uma variedade de ligantes na superfície de vírus e bactérias. O componente C1q inicia a cascata quando se liga à porção Fc do imunocomplexo IgG ou IgM [22]. A via das lectinas possui padrão de ativação similar a da via clássica [23]. A lectina, proteína similar ao C1q, liga-se especificamente aos resíduos de manose na superfície de vários patógenos. Após essa ligação ocorre ativação de duas serina esterases MASP-1 e MASP-2 que correspondem ao C1r e C1s da via clássica e cliva subsequentemente C2 e C3. A manose é um açúcar de

fase aguda que aumenta em resposta a citocinas inflamatórias [24]. A via alternativa pode ser iniciada pela ligação espontânea do componente C3 ativado do plasma à superfície do patógeno sem a necessidade de anticorpo específico [25]. Todas as vias resultam na formação de C3 convertase. A ativação de C3 convertase, cliva C3 em C3b e leva a formação do complexo de ataque à membrana (C5 a C9) [26].

Estudos em pacientes com deficiências homozigóticas das proteínas do complemento revelaram que deficiências de fatores da via clássica estão associados ao desenvolvimento de LES e de sintomas semelhantes ao LES mas não em relação as doenças autoimunes em geral [27]. Indivíduos com deficiência de C1q, C4 e C2 possuem maior risco de desenvolver LES que os indivíduos controles [28,29]. A deficiência de C1q é rara porém o desenvolvimento de LES em deficientes de C1q é alta, aproximadamente 93% [30]. Similarmente, 10% dos pacientes que possuem deficiência primária de C2 também desenvolvem LES assim como até 75% dos pacientes com deficiência completa de C4 [31].

A proteína C1q apresenta 460kDa e seu aspecto é parecido com o de uma tulipa. A macromolécula de C1q é composta de 18 cadeias peptídicas, 6 cadeias A, 6 cadeias B e 6 cadeias C que são produtos de três diferentes genes. Essas cadeias associadas formam a proteína funcional da molécula de C1q. Cada cadeia contém o domínio N-terminal semelhante ao colágeno no caule e o domínio C-terminal onde estão as cabeças globulares (Figura 1). Os genes C1qA, C1qB e C1qC estão na ordem A-C-B no braço curto do cromossomo 1 e cada gene tem três exons separados por dois introns [32, 33].

Figura1 - Representação esquemática da proteína C1q [33].

A maioria dos pacientes com deficiência de C1q apresentam LES antes dos 15 anos, forte associação com glomerulonefrite, vasculite de sistema nervoso central, bem como presença marcante de fotossensibilidade [34]. As peculiaridades clínicas do LES associado a essa deficiência genética têm sido um estímulo ao estudo das vias moleculares envolvidas na tolerância e no desenvolvimento de autoimunidade. Não existe relatos de deficientes de C1q que sejam indivíduos saudáveis, reforçando a teoria que o C1q participe do processo de regulação imune [35].

Um estudo mostrou que a análise da sequência do gene C1q em pacientes com deficiência completa permite a detecção de mutações nonsense e missense que oferecem explicação plausível para a perda de função do gene [36]. Entretanto existe forte evidência de que também mutações silenciosas possam influenciar na expressão do gene e participar no desenvolvimento do LES [37].

A deficiência de C4 também tem sido relacionada ao desenvolvimento do LES [38]. O gene C4 é codificado por dois loci separados, o C4A e o C4B que estão localizados no braço curto do cromossomo 6 junto ao complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe III. A diferença entre os dois isotipos de C4 na sequência de amino ácidos é de apenas 1% [39]. Acredita-se que C4A seja importante na remoção de imunocomplexos e C4B na propagação da ativação da cascata do complemento e na defesa contra microorganismos [40]. A completa ausência das proteínas C4A e C4B pode levar a diminuição da habilidade do sistema imune na defesa contra microorganismos e ineficiente remoção de imunocomplexos [41]. A sequência gênica do componente C4 humano é complexa, pois o tamanho dos isotipos C4A e C4B é diferente e o número de cópias de cada isoforma também varia nos indivíduos [42]. Baixo número de cópias de C4 também tem sido apontado com um fator de risco para o desenvolvimento de LES [43].

A deficiência de C2 é uma das mais frequentes entre as deficiências dos componentes iniciais do SC [44]. O gene C2 está localizado no braço curto do cromossomo 6 entre o loci HLA-D e HLA-B do MHC. A proteína C2 é formada por uma cadeia simples de glicoproteína e uma serino esterase [45].

A deficiência hereditária do componente C2 tem incidência de 1: 20.000 indivíduos na população caucasiana e está em desequilíbrio com o haplótipo, HLA-A25, B18, DR2 [46]. Mais da metade dos acometidos pela deficiência de C2 apresentam LES e/ou infecções piogênicas mas alguns indivíduos são assintomáticos [47]. Dois mecanismos moleculares distintos podem levar a deficiência de C2. A deficiência do tipo I está associada ao haplótipo HLA-A25, B18, C2Q0, BfS, C4A4, C4B2, DR2 e ocorre devido a deleção de 28pb no exon

6 do gene C2 [48,49]. A deficiência de C2 do tipo II é rara e representa 7% de todos os casos. A deficiência do tipo II é caracterizada pelo bloqueio da secreção de C2 com retenção do polipeptídico no compartimento intracelular [50]. Wetsel e colaboradores mostraram que a deficiência de C2 do tipo II ocorre devido a duas diferentes mutações missense. Uma localizada no exon 5 (p.Ser189Fen) associada ao haplótipo HLA-A11, B35, DR1 e a outra no exon 11 (p.Gly444Arg) associado ao haplótipo HLA-A2, B5, DR4 [51].

A caracterização molecular dos genes que codificam C1q, C4 e C2 do sistema complemento em pacientes com LES, podem revelar alterações associadas as deficiências desses componentes ajudando a compreender melhor a complexa etiopatogenia desta doença.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

1. Realizar a caracterização molecular dos genes C1q, C4 e C2 em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e respectivas deficiências.
2. Avaliar as expressões de mRNA dos genes C1q ,C4 e C2 em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e respectivas deficiências.

3. MÉTODOS

3. Métodos

3.1. Pacientes e Controles

Quatro pacientes com diagnóstico de LES Juvenil e deficiência primária de complemento previamente caracterizados pelos dados clínicos e laboratoriais [52] em seguimento na Unidade de Reumatologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foram avaliados. Uma paciente apresentava deficiência de C1q (P1), uma deficiência de C4 e C2 (P2), uma deficiência de C2 (P3) e uma deficiência de C4 (P4). Na tabela 1 estão descritos os parâmetros utilizados na caracterização das pacientes lúpicas com deficiência primária de complemento. Todos os pacientes preencheram os critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) para LES [15]. A admissão ao estudo das pacientes e de três indivíduos saudáveis ocorreu após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos pais ou responsáveis (Anexo 1). Todas as pacientes eram do sexo feminino e a idade ao diagnóstico variou de 6 a 13 anos.

Tabela 1 - Parâmetros utilizados na caracterização das pacientes lúpicas com deficiência primária de complemento [52].

Paciente	Dosagem C1q	Dosagem C2	Dosagem C3	Dosagem C4	Anti- C1q	SLEDAI 2-k	Número de cópias de C4
P1	0,0	8,7	0,87	0,11	17,0	20	Não realizado
P2	135,6	4,1*	1,02	0,0	10,9	6	2 cópias C4A 1 cópia de C4B
P3	4,6	3,4*	1,11	0,14	43,0	2	Não realizado
P4	38,7	14,6	0,76	0,04	29,0	16	2 cópias C4A 3 cópias C4B

Valores de referência: **C1q:** 33 – 209mg/l (Imunodifusão radial); **C2:** 14 – 25 mg/l (Imunodifusão radial); **C3:** 0,5 – 1,8 g/L (Nefelometria); **C4:** 0,1 – 0,4 g/L (Nefelometria); **Anti-C1q:** < 20 U (ELISA) * Deleção de C2 tipo I (Deleção de 28pb de C2)

3.2. Extração de DNA

Após coleta de 5ml de sangue periférico em tubo contendo EDTA, foi realizada a extração de DNA genômico utilizando o *QIAamp DNA Blood Midi kit* (cat. nº 51104 QIAGEN, DE) conforme as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi quantificada por espectrofotômetro (*Nanovue*®, GE Healthcare, USA). As amostras foram estocadas a -20°C no LIM 36.

3.3. Desenho dos iniciadores para caracterização molecular dos genes C1q e C2

Os iniciadores anterógrado e retrógrado utilizados para amplificação do DNA genômico dos genes C1q e C2 foram desenhados utilizando as sequências molde depositadas no *GenBank* NG_007282.1 e NG_011730, respectivamente e o programa *Primer-BLAST* (Primer3 Input, version 0.4.0/BLAST, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). A estratégia para a confecção dos iniciadores foi incluir todos os exons e as regiões 5' e 3' não traduzidas (UTR) que correspondem à região promotora (TATABOX) e a região de sinal de poliadenilação (AATAAA), respectivamente (Figura 2).

Nas tabelas 2 e 3 estão relacionados os iniciadores anterógrado e retrógrado para os genes C1q e C2, respectivamente. Os iniciadores C2-F e C2-R2 foram confeccionados apenas para amplificação da deleção de 28pb do gene C2. Nas tabelas estão descritos a posição do iniciador desenhado, a temperatura de fusão e o tamanho do fragmento.

Figura 2 - Representação da estratégia para desenho dos iniciadores dos genes C1qA, B, C e C2.

Tabela 2 - Relação dos iniciadores confeccionados para amplificação do gene C1q.

Região Gene/Exon	Iniciador Anterógrado	Iniciador Retrógrado	Posição	TM*	Fragmento (pb)
C1qA Exon 1	CCACATCCTCACAGGC	ACCCAGGAACCCTGGTC	5'UTR 9292..0220	60	533
	ACT	TTA	Exon 9146....9679		
C1qA Exon 2	ACATTGAGAGCCCCAG AGG	ATTCTCAGTGCCACCCC AAG	10192...10582	60	390
C1qA Exon 3.1	GAGGACCAGTAGGCAT TGGA	CAGACCTGGTCACCCTG CT	11497...12034	60	537
C1qA Exon 3.2	CTGTGACACCACCAAC AAGG	ACTAAGGACGGGCCTGA CTC	11953...12414 3'UTR	60	461
C1qB Exon 1	CCCTGCCCAGTGTAGA AGAA	CCCAGCTACCTGCACTG TTA	5'UTR 25644...26153	60	509
C1qB Exon 2	CACGGTGGTAACCTCT CACA	GACTTGGGAGGCAGGA GAC	32122...32427	60	305
C1qB Exon 3.1	CAGGCCTCCTTCTTTT GGTC	GCCACGCATGAGGTTCA C	33473...33903	60	430
C1qB Exon 3.2	ACCTACCACGCCAGCT CTC	ACTTCTGGTGTGCCAGG TG	3'UTR 33852...34302	60	450
C1qC Exon 1	AAATTCTGGGAAAGGG GATG	CCCCCAACCCTCTCATT C	5'UTR 16258...16684	60	426
C1qC Exon 2	CTGGGGAATGAGAGG GTTG	GTCAGCCCCAGACAGAC ACT	16661...16990	60	330
C1qC Exon 3.1**	CCCTGGAAGACACCCT CAG	CCGAGTTGACCTGATTG GTT	19868...20376	60	508

***TM**: Temperatura de Fusão

** A região 3'UTR do gene C1qC não foi avaliada.

Tabela 3 - Relação dos iniciadores confeccionados para amplificação do gene C2.

Região Gene/Exon	Iniciador Anterógrado	Iniciador Retrogrado	Posição	TM*	Fragmento (pb)
C2 Exon 1	TATGTGTTTGCCTGCGTGTT	TCACACATGGGAATTCAAGC	5'UTR 4924...4386	60	463
C2 Exon 2	CAGCTTGAATTCCCATGTGT	GCAAAAGCAACTTTGCCATC	4355...5792	59	451
C2 Exon 3	TTTTGACAGCCAGTTGACCA	CAACAGACTCCTATCCCCACA	6128...6533	60	432
C2 Exon 4	GGCTCTGGGACAGACATGG	CACGTCCTCAGGGAAGTCAT	10991...11410	61	420
C2 Exon 5	ATCTGCCGCCGTGAGTAG	CCTCCCTTTTCAGTGGCTGAG	11286...11586	61	352
C2 Exon 6	GAGGGAGGCAGAGAAGCTG	GTGAGTGGGGTTCTGAGGAG	11593...11900	60	382
C2 Exon 7	GGCCCTTTGTTTGTCTCTT	CACCAAGAGGCCTCACTCTC	13358...13679	60	383
C2 Exon 8	GGGGGAATAGAGTGATTCCCTA	CAGGCAGAGGGAGAATCAGA	14752...15063	60	381
C2 Exon 9	TTTGAAGCTCTCACAGGCAAT	AAAACCATGTGGCTCTGGAC	16622...16939	60	318
C2 Exon 10	GGGTCCAGCTCATGTAGGTC	CTGTGGGTGTGAGGATCAGA	20356...20736	60	392
C2 Exon 11	GAGTGAGCTTTGCCCTCCTT	CAGGGGAACAGGTGATTTTC	20614...20924	60	311
C2 Exon 12	GACACCCTGGCATGTCACTA	AGAGGCTGGGTGAGGTGGTA	20807...21106	61	300
C2 Exon 13	TGAAGCCACAGATCCTACCA	GGAGAAGAGCAAGGGTCACA	21072...21424	60	353
C2 Exon 14	CAGGTGCCTGGAGTCTGG	GATGTTGGTGCTGGTCCTTT	21319...21608	60	310
C2 Exon 15	TTTGGGGGTGATAACAAGGA	CTTGGGAGGAGGGGTGAC	21548...21856	60	309
C2 Exon 16	AACCTCCCAAAGTGCTGAGA	CTAGGGCAGTGGACTGGTGT	22145...22439	60	314
C2 Exon 17	AAGGCCACCTGTGTCTCTGT	CCCAACTGTAAGCCCCAAC	22399...22649	60	250
C2 Exon 18.1	CCAGGGGTTACAGGATCTCA	GCATCCTAGAGACCCGGATT	22567...23000	60	434
C2 Exon 18.2	ATGGCCA CTGAGCCCTCT	GTCTCTGACCTGCCTTCCTG	3'UTR 22872...23821	60	410
C2 F/R2	GCCTGGGCCGTAAAATCCA	GCACAGGAAGGCCTCTGCTG CAGGC	11600...11640	60	239

*TM: Temperatura de Fusão

3.4. Sequenciamento dos genes C1q e C2

O produto de amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) foi purificado utilizando o *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (cod. 28-

9034-71 GE Healthcare Life Sciences, USA), seguindo o protocolo do fabricante. O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano utilizando o *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (cod. 4337456 Applied Biosystems, USA). As reações de sequenciamento foram realizadas no *ABI 3730 DNA Analyser* (Applied Biosystems, USA). Os cromatogramas e as sequências de nucleotídeos obtidas foram visualizadas utilizando o programa *Chromas* (<http://chromaspro.findmysoft.com>). As sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas com as disponíveis no *GenBank*, utilizando o programa *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A nomenclatura usada para descrever variação nas sequências gênicas foi normatizada segundo o site *Human Genome Variation Society* [53].

3.5. Detecção da deficiência de C2 do tipo I

O DNA genômico foi amplificado pela PCR para detecção da deleção de 28bp do gene C2 utilizando os iniciadores C2-F e C2-R2. Posteriormente foi realizado o sequenciamento seguindo as mesmas condições descritas anteriormente para a confirmação da deficiência do tipo I e detecção de variações na sequência do gene C2.

3.6. Desenho dos iniciadores para análise de expressão de mRNA do gene C4

Para a amplificação do mRNA do gene C4 foram desenhados dois pares de iniciadores, um para o gene C4A e outro para o gene C4B. A estratégia foi desenhar o iniciador na região entre o exon 26 e 28 do gene C4 onde estão localizados os cinco nucleotídeos que diferem entre os genes C4A e C4B. Para o desenho dos iniciadores foi utilizada a sequência molde depositada no *GenBank* NG_011638. A tabela 4 mostra os iniciadores desenhados para o gene C4.

Tabela 4 - Relação dos iniciadores confeccionados para amplificação do gene C4.

Região Gene/Exon	Iniciador Anterógrado	Iniciador Retrógrado	Posição	TM*	Fragmento (pb)
C4 A	CCTGTCCAGTGTTAGACAG	GGCTTCCACTCTCTGCTTCA	3410...3429	55	250
C4 B	CTCTCTCCAGTGATACATAG	TTGGTCAGTGTGAGGGCATA	3411...3635	60	450

*TM: Temperatura de Fusão

3.7. Análise da expressão de mRNA de C1q, C4 e C2

Para avaliação da expressão de mRNA dos genes C1q, C4 e C2, células mononucleares (monócitos e linfócitos) foram obtidas de sangue periférico e cultivadas em meio DMEM (soro fetal bovino 10% e solução de antibióticos penicilina 10.000u/mL e estreptomicina 10.000µg/mL - 1%) por 36 horas. Simultaneamente foi realizada cultura com estímulo com 100U/µl de interferon gama (IFN-γ). O sobrenadante das culturas com e sem estímulo foi armazenado a -20°C para posterior análise. As culturas de células foram realizadas somente para os pacientes P1, P3 e P4. A extração de RNA foi realizada pelo *RNeasy Midi kit* (nº cat. 74104 Qiagen, USA) conforme as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi quantificada por espectrofotômetro (Nanovue®, GE Healthcare, USA). Após a extração de RNA foi realizada a síntese de cDNA utilizando 500 ng de RNA total pelo kit *SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (cod.18080-051 Invitrogen, USA) conforme as instruções do fabricante e armazenado a -20°C.

3.7.1 Análise qualitativa

Primeiramente foi realizada a reação em cadeia de polimerase pela transcrição reversa (RT-PCR) para verificar se os pacientes expressavam o mRNA dos componentes C1qA, C1qB, C1qC e C2 do complemento. Para a reação de amplificação foram utilizados 2µl de cada amostra de cDNA para um volume final de 25µl contendo tampão da enzima [1x], 1,5mM de MgCl₂, 100µM de cada dNTP, 5 µM de cada iniciador e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, nas seguintes condições: denaturação inicial a 95°C por 5 min seguido de 40 ciclos a 95°C por 30s; 60°C por 30s, 72°C por 30s, e um ciclo final de 7 min a 72°C para uma completa extensão das fitas. As reações foram realizadas utilizando o termociclador MJ Research PTC- 200 Thermal Cycler. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5 % e as bandas coradas com brometo de etídio e visualizadas por meio de transluminador de luz ultravioleta. Os iniciadores utilizados foram: C1q A exon 2, C1q B exon 2, C1q C exon 2 e C2 exon 13 (Tabelas 2 e 3). O gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi escolhido como controle endógeno por manter as funções celulares básicas em condições normais e ser o gene mais comumente utilizado em comparações de dados de

expressão de genes. Os iniciadores utilizados foram GAPDH F: 5' – ACCACAGTCCATGCCATCAC – 3' e GAPDH R: 5' – TCCACCACCCGTTTGCTGTA – 3'.

3.7.2 Análise quantitativa

A expressão de mRNA dos componentes C1qA, C1qB, C1qC, C2, C4A e B do complemento foi determinada por meio da PCR em tempo real quantitativa (qPCR). A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25µl contendo 1X *SYBR Green Mix* do kit *QuantiFast SYBR Green PCR Kit* (cat. nº 204054 *QIAGEN, DE*), 1µM de iniciadores e 2µl de cDNA. A condição de amplificação foi de 95°C por 10 min seguido de 40 ciclos para os genes C1q A, B e C, C2 e C4B e de 50 ciclos para o gene C4A a 95°C por 3s e 60°C por 30s. As reações foram realizadas utilizando termociclador *Applied Biosystems StepOne Plus Real Time PCR* (Applied Biosystems, USA). A análise quantitativa da expressão de mRNA para os genes C1q A, B e C, C2, C4A e C4B foi realizada tanto para pacientes como para os controles saudáveis.

A expressão de mRNA dos pacientes e controles foi obtida através da quantificação relativa utilizando o método da curva padrão. Este método consiste em utilizar uma amostra de RNA (controle) que será utilizada para a obtenção da curva padrão para cada gene analisado. Essas curvas foram obtidas por meio de 5 pontos de diluição do cDNA obtido do RNA da amostra padrão. As diluições foram de 10x sendo que o primeiro ponto foi de 10⁰ e o

último ponto de 10^{-5} e todos os pontos de diluições foram realizados em triplicata. Obtidos os valores de expressão de cada amostra foi realizada a normalização que é a relação do gene-alvo menos o gene endógeno. Essa normalização é chamada de variação relativa da expressão (VRE). Como havia apenas um paciente para cada deficiência analisada foram feitas réplicas experimentais. As réplicas experimentais são ensaios *in vitro* realizados de forma independente. Todos os ensaios amostras foram realizados em triplicata. Na qPCR foram utilizados 5ng de cDNA total num volume final de 25µl contendo 100µM de cada iniciador.

Os valores absolutos da VRE foram utilizados para os cálculos de mediana. Os valores mínimos e máximos foram incluídos nos gráficos e nas tabelas para a apresentação dos resultados.

3.8 Quantificação de C1q no sobrenadante da cultura

A quantificação de C1q no sobrenadante da cultura foi realizado pelo método de imunodifusão radial com limite inferior de detecção de 0,6mg/dL (The Binding Site, Birmingham, UK).

4. RESULTADOS

4. Resultados

As características clínicas, os auto-anticorpos e a evolução clínica das pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil selecionados para o estudo estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Características clínicas, laboratoriais e evolução clínica das pacientes com lúpus eritematoso sistêmico selecionados para o estudo.

Paciente	Idade ao Diagnóstico	SLEDAI-2K	Características Clínicas	Auto-anticorpos positivos	Infecções Recorrentes	Medicamentos	Seguimento
P1 (C1q D)	6	20	Fotosensibilidade e glomerulonefrite membranosa	FAN (1:80), anti-dsDNA, anti-Sm, anti-RNP e anti-La	Não	Prednisona, Cloroquina, Micofenolato e Ciclofosfamida	Sim
P2 (C2 e C4 D)	15	6	Glomerulonefrite proliferativa difusa e trombocitopenia	FAN (1:640), anti-Ro, anti-La, aCLIgG (25 GPL) aCLIgM (16MPL) e IAA	Herpes Zoster	Prednisona e Cloroquina	Não (óbito)
P3 (C2 D)	6	2	Serosite, artrite, linfopenia, fotosensibilidade, alopecia e úlceras orais	FAN (1:280), anti-dsDNA e aCLIgM (61MPL)	Tuberculose ganglionar e citomegalovírus	Prednisona e Cloroquina	Sim
P4 (C4 D)	6	16	Artrite, serosite, convulsões, anemia hemolítica e asma	FAN (1:80), anti-dsDNA, aCLIgG (14GPL) e aCLIgM (13 GPL)	Infecção fúngica sistêmica (Candida sp) e herpes zoster	Prednisona e cloroquina	Sim

4.1. Caracterização molecular da deficiência de C1q

A paciente P1 foi previamente identificada (tabela 1) como deficiente de C1q por apresentar níveis indetectáveis de C1q no soro, anti-C1q negativo e frações C3 e C4 do complemento normais.

O sequenciamento dos 3 exons dos genes C1qA, B e C da paciente P1 resultou um total de 6.146 bases nucleotídicas e revelou quatro alterações de bases nucleotídicas, uma no gene C1qA, duas no gene C1qB e uma no gene C1qC.

No gene de C1qA observou-se uma alteração heterozigota de base nucleotídica A por G (c.276 A>G Gly, NM_015991) no exon 3 (C1qA3.1) (Figura 3).

No sequenciamento do gene de C1qB foi observada uma alteração homozigota de base nucleotídica T por G na região 5'UTR (c.-159 T>G). Esta região não é codificadora ou traduzida, entretanto sabe-se que contém regiões promotoras do gene (Figura 4). Na região 3'UTR foi observada uma alteração homozigota de base nucleotídica A por G (c*78 A>G), esta região não codificadora é responsável pela estabilização do gene (Figura 5).

No gene C1qC foi observada uma alteração heterozigota no exon 2 onde ocorreu a troca da base nucleotídica C por T sem troca de aminoácido (c.126 C>T Pro) (Figura 6).

Figura 3 - Sequenciamento do gene C1qA exon 3 da paciente P1.

A: Cromatograma do sequenciamento; a seta indica a alteração heterozigota R= A/G. **B:** Sequência de aminoácidos, a seta indica o local da troca.

Figura 4 - Sequenciamento do gene C1qB exon 1 da paciente P1.

Cromatograma do sequenciamento; a seta indica a alteração homozigota T/G na região 5'UTR.

Figura 5 - Sequenciamento do gene C1qB exon 3 da paciente P1. Cromatograma do sequenciamento; a seta indica a alteração homozigota A/G na região 3'UTR.

Figura 6 - Sequenciamento do gene C1qC exon 2 da paciente P1. **A:** Cromatograma do sequenciamento; a seta indica a alteração heterozigota Y=C/T. **B:** Sequência de aminoácidos, a seta indica o local da troca.

Adicionalmente o gene C1q da mãe da paciente P1 foi sequenciado para comparação. No gene C1qA da mãe foram observadas uma alteração homozigota no exon 3 onde ocorre a troca da base nucleotídicas c.276 A>G Gly, a qual não levou a troca de aminoácido e uma mutação missense c.295

A>C , na qual ocorreu a troca de uma isoleucina (Ile) por uma leucina (Leu) (Figura 7).

No sequenciamento do gene C1qB da mãe foram observadas as mesmas alterações homozigotas presente no paciente P1. As Figuras 8 e 9 mostram as trocas da base nucleotídicas das regiões 5'UTR (c.-159 T>G) e 3' UTR (c*78 A>G).

No gene C1qC da mãe também foi observada a mesma alteração heterozigota presente no paciente P1. A Figura 10 mostra a troca da base nucleotídica C por T.

A

Sequência de referência																
93	GGG	CCC	AGC	GGC	CCC	CTC	GGA	GCC	CGT	GGC	ATC	CCG	GGA	ATT	AAA	137
30	Gly	Pro	Ser	Gly	Pro	Leu	Gly	Ala	Arg	Gly	Ile	Pro	Gly	Ile	Lys	44
<div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div></div>																
Mãe P1																
93	GGG	CCC	AGC	GGC	CCC	CTC	GGG	GCC	CGT	GGC	ATC	CCG	GGA	CTT	AAA	137
30	Gly	Pro	Ser	Gly	Pro	Leu	Gly	Ala	Arg	Gly	Ile	Pro	Gly	Leu	Lys	44
<div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div></div>																
P1																
93	GGG	CCC	AGC	GGC	CCC	CTC	GGG	GCC	CGT	GGC	ATC	CCG	GGA	ATT	AAA	137
30	Gly	Pro	Ser	Gly	Pro	Leu	Gly	Ala	Arg	Gly	Ile	Pro	Gly	Ile	Lys	44

B

Figura 7 - Sequenciamento do gene de C1qA exon 3 da mãe da paciente P1. **A:** Cromatograma do sequenciamento do gene; a primeira seta indica a alteração homozigota A/G e a segunda seta a mutação missense M= A/C. **B:** Sequência de aminoácidos; a primeira seta indica a base com alteração no paciente P1 e na mãe e a segunda seta a troca (Ile> Leu) presente apenas na mãe do paciente P1.

Figura 8 - Sequenciamento da região 5'UTR do gene C1qB da mãe da paciente P1. Cromatograma do sequenciamento; a seta indica a troca homozigota T/G na região 5'UTR.

Figura 9 - Sequenciamento da região 3'UTR do gene C1qB da mãe da paciente de P1. Cromatograma do sequenciamento; a seta indica a troca homozigota A/G na região 3'UTR.

A **B**

Sequência de referência																
91	GGC	TGC	TAC	GGG	ATC	CCA	GGG	ATG	CCC	GGC	CTG	CCC	GGG	GCA	CCA	135
31	Gly	Cys	Tyr	Gly	Ile	Pro	Gly	Met	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Ala	Pro	45

Mãe P1																
91	GGC	TGC	TAC	GGG	ATC	CCA	GGG	ATG	CCC	GGC	CTG	CCT	GGG	GCA	CCA	135
31	Gly	Cys	Tyr	Gly	Ile	Pro	Gly	Met	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Ala	Pro	45

P1																
91	GGC	TGC	TAC	GGG	ATC	CCA	GGG	ATG	CCC	GGC	CTG	CCT	GGG	GCA	CCA	135
31	Gly	Cys	Tyr	Gly	Ile	Pro	Gly	Met	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Ala	Pro	45

Figura 10 - Sequenciamento do gene C1qC exon 2 da mãe da paciente P1. **A**: Cromatograma do sequenciamento do gene; a seta indica a alteração heterozigota Y= T/C. **B**: Sequência de aminoácido, a seta indica o local da troca.

4.2. Análise qualitativa da expressão de mRNA de C1q

O RT-PCR qualitativo foi realizado para análise preliminar da expressão de mRNA do gene C1q na paciente P1 e comparado com as amostras controles. As Figuras 11 e 12 mostram os resultados do RT-PCR qualitativo para a expressão dos genes C1q A, B e C. A paciente P1 e sua mãe

apresentaram expressão de mRNA semelhante ao controle saudável com e sem estímulo de IFN- γ .

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%. RT-PCR da expressão de mRNA do gene C1q e controle endógeno GAPDH de células mononucleadas do paciente P1. Células cultivadas por 36 horas com e sem estímulo de IFN- γ . **A:** Expressão do controle endógeno GAPDH das amostras das pacientes P1 e P3 e controle saudável. **B:** Linha 1: Escala 100pb. Linhas 2, 3 e 4: Amostra controle do gene C1qA, amostra sem estímulo de IFN- γ e amostra com estímulo de IFN- γ do gene C1qA da paciente P1, respectivamente. Linhas 5, 6 e 7: Amostra controle do gene de C1qB, amostra sem estímulo de IFN- γ e amostra com estímulo de IFN- γ do gene C1qB da paciente P1, respectivamente. Linhas 8, 9 e 10: Amostra controle do gene C1q C, amostra sem estímulo de IFN- γ e amostra com estímulo de IFN- γ do gene C1q C da paciente P1, respectivamente.

Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%. RT-PCR da expressão de mRNA do gene C1q das células mononucleadas da mãe da paciente P1. Células cultivadas por 36 horas com e sem estímulo de IFN- γ .

A: Linha 1: Escala 100pb. Linhas 2 e 3: Amostra controle do gene C1qA.

Linhas 4 e 5: Amostra com estímulo de IFN- γ e amostra sem estímulo de IFN- γ do gene C1qA da mãe da paciente P1, respectivamente. Linhas 6 e 7: Amostra controle do gene C1qB. Linhas 8 e 9: Amostra com estímulo de IFN- γ e amostra sem estímulo de IFN- γ do gene C1qB da mãe da paciente P1, respectivamente. **B:** Linha 1: Escala 100pb. Linhas 2 e 3: Amostra controle do gene C1qC. Linhas 4 e 5: Amostra com estímulo de IFN- γ e amostra sem estímulo de IFN- γ do gene C1qC da mãe da paciente P1, respectivamente.

4.3. Análise quantitativa da expressão de mRNA de C1q

A análise quantitativa mostrou que a mediana de expressão de mRNA de C1qA da paciente P1 sem estímulo de IFN- γ foi 1,3 vezes menor quando comparada aos controles e com estímulo de IFN- γ estava 1,6 vezes mais expresso se comparado aos controles. Na tabela 6 e figura 13 estão apresentados os valores da VRE da paciente P1 e dos controles. A expressão de mRNA de C1qB sem estímulo de IFN- γ do paciente P1 foi 2,2 vezes menor e com estímulo de IFN- γ estava 1,5 vezes mais expresso se comparado aos controles (Tabela 7 e Figura 14). Nos indivíduos controles a expressão de mRNA C1qC não foi significativa porém a paciente P1 apresentou pequena expressão com e sem estímulo (Tabela 8 e Figura 15).

4.4. Quantificação de C1q no sobrenadante da cultura

As dosagens de C1q no sobrenadante da cultura celular da paciente P1 e dos indivíduos controles foram muito baixas e não foi possível a detecção pelo método empregado.

Tabela 6 - Valores da variação relativa de expressão (VRE) de mRNA do gene C1qA nos controles e na paciente P1 com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).

Amostras	C1qA com estímulo de IFN- γ	C1qA sem estímulo de IFN- γ
Controle 1	232,54	1918,40
Controle 2	346,47	1515,22
Controle 3	442,71	1468,72
Mediana Controles	346,47	1515,22
Paciente P1 / 1*	815,97	1062,46
Paciente P1 / 2*	257,98	1125,49
Paciente P1 / 3*	564,93	1246,44
Mediana Paciente P1	564,93	1125,49

*Replicas experimentais

Figura 13 - Valores da variação relativa de expressão (VRE) de mRNA do gene C1qA nos controles e na paciente P1 com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).

Tabela 7 - Valores da variação relativa de expressão (VRE) de mRNA do gene C1qB nos controles e na paciente P1 com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).

Amostras	C1qB com estímulo de IFN- γ	C1q B sem estímulo de IFN- γ
Controle 1	315,10	1322,44
Controle 2	529,37	1077,39
Controle 3	239,10	1095,47
Mediana Controles	315,10	1095,47
Paciente P1 / 1*	492,10	318,6
Paciente P1 / 2*	476,09	547,63
Paciente P1 / 3*	691,12	484,55
Mediana Paciente P1	492,10	484,55

*Replicas experimentais

Figura 14 - Valores da variação relativa de expressão (VRE) de mRNA do gene C1qB nos controles e na paciente P1 com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).

Tabela 8 - Valores da variação relativa de expressão (VRE) de mRNA do gene C1qC nos controles e na paciente P1 com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).

Amostras	C1qC com estímulo de IFN- γ	C1qC sem estímulo de IFN- γ
Controle 1	-334,08	-143,87
Controle 2	-497,99	-437,72
Controle 3	-441,83	-474,50
Mediana Controles	-441,83	-437,72
Paciente P1 / 1*	259,47	69,99
Paciente P1 / 2*	310,57	40,29
Paciente P1 / 3*	309,95	-17,13
Mediana Paciente P1	309,95	40,29

*Replicas experimentais

Figura 15 - Valores da variação relativa de expressão (VRE) de mRNA do gene C1qC nos controles e na paciente P1 com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).

4.5. Caracterização molecular da deficiência de C2

As pacientes P2 e P3 foram previamente caracterizados como heterozigotos para a deficiência de C2 do tipo I (deleção de 28pb) (Figura16).

Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose a 2,0%. PCR das pacientes P2 e P3. Linha 1: Escala 100bp. Linha 2 e 3: Amostras das pacientes P2 e P3, respectivamente. Linha 4 e 5: Controle positivo e controle negativo da reação, respectivamente.

O sequenciamento dos 18 exons do gene C2 das pacientes P2 e P3 resultou em 10.292 bases nucleotídicas para cada paciente e revelou a mesma sequência nucleotídica quando comparada a depositada no *GenBank* NG_011638, não mostrou nenhuma outra variação e confirmou a presença da deleção de 28bp em ambos os pacientes (Figuras 17 e 18).

Figura 17 - Cromatograma do sequenciamento do gene C2 da paciente P2. **A:** Cromatograma do início do sequenciamento do gene C2 /exon 1 **B:** Cromatograma do final do sequenciamento do gene C2/ exon 18.2.

A **B**

	60	*	80	*	100	
C2	:	TCAAGGAGAGCGCCTCCCTCATGGTGGACAGGGTCAGGAATCAGGAGTCT	:	100		
P2	:		-----	:	73	
P3	:		-----	:	73	

Figura 18 - Cromatograma do sequenciamento do exon 6 do gene C2 (deleção 28pb) das pacientes P2 e P3 **A**: Cromatograma do sequenciamento do gene de C2 das pacientes P2 e P3 **B**: A região pontilhada mostra a deleção de 28pb no gene C2 nas pacientes P2 e P3.

4.6. Análise qualitativa da expressão de mRNA de C2

O RT-PCR foi realizado para análise preliminar da expressão de mRNA do gene C2 na paciente P3 e comparado com controles saudáveis. A paciente P2 também foi considerado deficiente de C2 mas não foi possível realizar a

cultura de mononucleares e a análise de expressão de mRNA. A Figura 19 mostra os resultados de expressão de mRNA de C2 do paciente P3 (linha 8 e 9) com ou sem estímulo de IFN- γ . (Figura 19).

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%. RT-PCR da expressão de mRNA do gene C2 e GAPDH das células mononucleadas da paciente P3. Células cultivadas por 36 horas com e sem estímulo de IFN- γ . Linha 1: Escala 100pb. Linha 2: Amostra controle do gene GAPDH. Linha 3 e 4: Amostra sem estímulo de IFN- γ e amostra com o estímulo de IFN- γ da paciente P3 para o gene GAPDH. Linha 5 e 6: Amostra sem estímulo de IFN- γ e amostra com o estímulo de IFN- γ da paciente P1 para o gene GAPDH. Linha 7: Amostra controle do gene C2. Linha 8 e 9: Amostra sem estímulo de IFN- γ e amostra com estímulo de IFN- γ da paciente P3 para o gene C2.

4.7. Análise quantitativa da expressão de mRNA de C2

Os resultados da análise quantitativa da expressão de mRNA do gene C2 da paciente P3 mostrou que sem estímulo de IFN- γ a expressão estava 23

vezes mais baixa quando comparada aos controles e com estímulo de IFN- γ estava 4,2 vezes menos expresso que os controles (Tabela 9 e Figura 20).

Tabela 9 - Valores da variação relativa de expressão (VRE) de mRNA do gene C2 nos controles e na paciente P3 com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).

Amostras	C2 com estímulo de IFN- γ	C2 sem estímulo de IFN- γ
Controle 1	96,55	274,5
Controle 2	27,17	64,28
Controle 3	210,41	351,66
Mediana Controles	96,55	274,5
Paciente P3 / 1*	12,26	11,49
Paciente P3 / 2*	59,07	3,01
Paciente P3 / 3*	22,97	138,67
Mediana Paciente P3	22,97	11,49

*Replicas experimentais

Figura 20 - Valores da variação relativa de expressão (VRE) de mRNA do gene C2 nos controles e na paciente P3 com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).

4.8. Caracterização molecular da deficiência de C4

A paciente P4 foi considerada deficiente de C4 por apresentar baixos níveis séricos de C4 após repetidas dosagens e níveis normais de C1q, C2 e C3. O número de cópia de C4A foi de 2 cópias e de C4B de 3 cópias. A correlação entre baixos níveis séricos e menor número de cópias revelou então a deficiência de C4.

O primer desenhado para a amplificação de C4A não foi específico para a reação, apresentando muitas ligações inespecíficas durante a amplificação, portanto a análise quantitativa de expressão de mRNA de C4A não foi realizada. A expressão de mRNA de C4B na paciente P4 foi 14 vezes menor sem estímulo e foi com estímulo foi semelhante quando comparadas aos controles. Os resultados são apresentados na tabela 10 e na figura 21.

Tabela 10 - Valores da variação relativa de expressão (VRE) de mRNA do gene C4B nos controles e na paciente P4 com e sem estímulo de interferon gama (IFN- γ).

Amostras	C4B com estímulo de IFN- γ	C4B sem estímulo de IFN- γ
Controle 1	533,12	4660,57
Controle 2	2427,82	59991,01
Controle 3	1384,43	2192,59
Mediana Controles	1384,43	4660,57
Paciente P4 /1*	1370,01	310,7
Paciente P4 /2*	1179,91	319,71
Paciente P4 / 3*	977,19	777,44
Mediana Paciente P4	1179,91	319,71

*Replicas experimentais

Figura 21 - Valores da variação relativa de expressão (VRE) de mRNA do gene C4B nos controles e na paciente P4 com e sem estímulo de interferon

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

A caracterização molecular dos genes C1q, C4 e C2 dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil mostrou variantes alelicas, trocas homozigotas em regiões não codificantes e alterações na expressão de mRNA no gene C1q; deficiência heterozigota de C2 do tipo I e baixa expressão de mRNA de C4B.

Dentre todas as deficiências dos componentes iniciais do sistema complemento, a deficiência de C1q é considerada fator de risco para o desenvolvimento de LES [5,6,28,30,56,62]. Uma série de estudos avaliou mutações no gene C1q, sendo a mais frequente a mutação nonsense em C1qA Gln 208X [55,56,57]. Entre as mutações silenciosas a mais frequente é a do exon 2 C1qA Gly70 [37]. Apenas um estudo avaliou a expressão de mRNA dos genes do sistema complemento em pacientes com leucemia monocítica aguda [58].

A caracterização molecular do gene C1q da paciente P1 revelou duas mutações silenciosas heterozigotas e trocas homozigotas nas regiões UTR. Estas mutações silenciosas não estão descritas e não está estabelecido até o momento se mutações silenciosas e trocas de base em regiões não codificantes estão relacionadas à produção inadequada da proteína C1q. Análises mais detalhadas, como a quantificação da proteína e avaliação da regulação serão valiosas para o estabelecimento destas relações. No entanto, podemos considerar que as alterações na região 5'UTR que corresponde a região promotora e a na região 3'UTR que corresponde a região de

estabilização do mRNA podem ser responsáveis por uma transcrição alterada do gene de C1q. Rafiq e colaboradores relataram que variações nos alelos na região UTR de C1qB podem estar associada a baixos níveis séricos de C1q [54].

Por outro lado, a mãe do paciente P1 apresentou as mesmas mutações silenciosas e trocas de base e uma mutação missense adicional, porém ela não apresentava sintomas clínicos de doença autoimune. Desde modo, podemos considerar que a mutação missense encontrada na mãe do paciente P1 possa levar a um reequilíbrio da regulação e consequentemente na produção de C1q, uma vez que os níveis séricos de C1q da mãe eram normais.

Um ponto intrigante do trabalho foi a diferença na expressão de mRNA nas culturas com e sem estímulo. O IFN- γ é uma citocina produzida principalmente por células natural *killer* e linfócitos T durante a resposta imune resultando em inflamação e descrito como indutor da produção de complemento em monócitos [58,59]. Nas culturas estimuladas com IFN- γ todas as cadeias de C1q tiveram aumento na expressão de mRNA, sugerindo que as alterações moleculares observadas no gene C1q podem levar a alterações na expressão de mRNA e baixos níveis séricos de C1q. Há descrição que uma única falha em qualquer cadeia do gene de C1q possa comprometer toda a síntese e secreção da proteína de C1q [57]. As mutações e alterações na expressão de mRNA podem ter sido fatores que contribuíram para a ausência de C1q no soro do paciente P1. A avaliação da expressão de mRNA da mãe do paciente seria de grande valia na elucidação destas hipóteses.

Os genes C4A e C4B são extremamente complexos e extensos, cada gene possui 41 exons. O gene C4A se diferencia do C4B por apenas

cinco nucleotídeos e codificam as isoformas C4A e C4B [39]. Essa pequena diferença no número de nucleotídeos impossibilitou a avaliação da expressão de mRNA de C4A.

A proteína C4A atua na remoção de imunocomplexos, já o C4B na defesa imune contra microorganismos e na ativação da cascata do complemento [40]. A ausência da proteína C4 está relacionada a falhas na remoção de imunocomplexos, contribuindo para lesões inflamatórias em diversos órgãos [38]. Deficiências de C4A e C4B têm sido relacionadas a um maior risco de desenvolvimento de LES [42].

A paciente P4 apresentava níveis séricos de C4 persistentemente baixos, 2 cópias de C4A e 3 de C4B e a expressão de mRNA de C4B foi 14 vezes mais baixa sem estímulo de IFN- γ e com estímulo foi semelhante aos controles. Infelizmente não foi realizado o sequenciamento dos genes C4A e C4B e também não foi possível avaliar a expressão de mRNA de C4A, no entanto, a alteração de expressão de mRNA de C4B com e sem estímulo sugere que a paciente P4 possa apresentar mutações neste gene, pois a paciente apresentava infecções frequentes e a fração C4B está diretamente relacionada a ativação do sistema complemento. Adicionalmente, a paciente apresentava apenas 2 cópias de C4A e essa proteína C4A atua na remoção de imunocomplexos o que poderia ter contribuído para o desenvolvimento do LES.

Deste modo, conclui-se que a dosagem sérica e a avaliação do número de cópias podem não ser suficientes para a avaliação da deficiência de C4 e talvez a avaliação de expressão de mRNA pode ser mais informativa em relação a presença de alteração no gene.

Os sequenciamentos do gene C2 dos pacientes P2 e P3 não mostraram nenhuma mutação adicional, confirmando apenas a presença da deleção de 28bp. A deficiência de C2 do tipo I é a mais frequente entre as deficiências de complemento, porém a sua identificação nem sempre é fácil uma vez que não há uma direta relação com os níveis séricos da proteína [49].

A deficiência de C2 do tipo I remove 9pb da porção 3' final do exon 6 e 19pb da região 5' do intron subsequente. Esta deleção de 28pb leva a uma alteração na leitura e a um codon de parada prematuro [49,61]. No entanto, indivíduos com esta mutação podem apresentar níveis séricos de C2 tanto normais quanto reduzidos [49].

A avaliação da expressão de mRNA de C2 mostrou-se reduzida tanto sem como com estímulo de interferon gama o que sugere que a deleção de 28pb no exon 6 possa interferir na regulação de mRNA e estar diretamente relacionada aos níveis séricos reduzidos de C2 observados nestas pacientes.

Mais da metade dos indivíduos que apresentam deficiência de C2 desenvolvem LES [47,60]. Considerando que a deficiência de C2 do tipo I está associada aos haplótipos HLA-A25, B18, C2Q0, BfS, C4A4, C4B2, DR2 [48,49] e que estes haplótipos também tem sido relacionado ao LES, podemos considerar a deficiência possa ter algum papel relevante no LES.

Nossos resultados sugerem que pacientes com LESJ devem ser avaliados quanto aos níveis séricos de C2 e que mesmo pacientes com níveis detectáveis devem ser avaliados para a deficiência de C2 do tipo I. Apesar da paciente P3 também apresentar níveis séricos baixos de C1q, a caracterização molecular de C1q não foi realizada, pois esta paciente apresentava anti-C1q positivo.

Este estudo apresentou algumas limitações. Primeiro, o número reduzido de pacientes analisados para cada deficiência, segundo a necessidade de se realizar réplicas experimentais para obter valores para comparação com os controles e terceiro a necessidade de obtenção de células mononucleares recentemente coletadas para a avaliação de expressão de mRNA.

Por outro lado, neste foram realizadas algumas análises inéditas. O sequenciamento de todos os exons do gene C1q, incluindo as regiões não codificantes, tanto da paciente com LESJ como de sua mãe, a avaliação da expressão da mRNA de todas as cadeias do gene C1q, do gene C2 e do gene C4B .

Deste modo, não apenas mutações missense e nonsense, mas também mutações silenciosas e trocas de base em regiões não codificantes podem modificar a transcrição do mRNA e consequentemente, a produção de C1q. A deficiência de C2 do tipo I deve ser avaliada em pacientes com LESJ mesmo com níveis séricos detectáveis. Finalmente, a dosagem sérica e a avaliação do número de cópias podem não ser suficientes para a avaliação da deficiência de C4 em pacientes com LESJ.

6. CONCLUSÕES

6. Conclusões

1. Mutações silenciosas e trocas de base nas regiões promotora e de estabilização do mRNA do gene C1q podem modificar a transcrição do mRNA e conseqüentemente sua expressão levando a níveis baixos ou indetectáveis da proteína.
2. Não só a deficiência homozigota, mas também a deficiência hererozigota de C2 tipo I (deleção de 28bp) pode contribuir para baixa expressão de mRNA e níveis séricos baixos de C2.
3. A baixa expressão de mRNA de C4B mostrou que as dosagens séricas e a avaliação do número de cópias podem não ser suficientes para estabelecer a deficiência de C4.

7. REFERÊNCIAS

7. Referências

1. Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Walport MJ. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency and apoptosis. *Adv Immunol.* 2004;76:227-34.
2. Rhodes B, Vyse TJ. General aspects of the genetics of SLE. *Autoimmunity.* 2007;40:550-9.
3. Simard JF, Costenbader KH, Liang MH, Karlson EW, Mittleman MA. Early-life exposure to cigarette smoke and adult-onset SLE. *Lupus.* 2009;18:431-5.
4. Vilar MJP, Sato EI. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal,Brazil). *Lupus.* 2002;11:528-32.
5. Manderson AP, Botto M, Walport MJ. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Ann Rev Immunol.* 2004;22:431-56.
6. Pickering MC, Walport MJ. Links between complement abnormalities and systemic lupus erythematosus. *Rheumatology.* 2000;39:133-41.
7. Gateva V, Sandling JK, Hom G, Taylor KE, Chung SA, Sun X, Ortmann W, Kosoy R, Ferreira RC, Nordmark G, Gunnarsson I, Svenungsson E, Padyukov L, Sturfelt G, Jönsen A, Bengtsson AA, Rantapää-Dahlqvist S, Baechler EC, Brown EE, Alarcón GS, Edberg JC, Ramsey-Goldman R, McGwin G Jr, Reveille JD, Vilá LM, Kimberly RP, Manzi S, Petri MA, Lee A, Gregersen PK, Seldin MF, Rönnblom L, Criswell LA, Syvänen AC, Behrens TW, Graham RR. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2009;41;1228-33.

8. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, Cho JH, Guttmacher AE, Kong A, Kruglyak L, Mardis E, Rotimi CN, Slatkin M, Valle D, Whittemore AS, Boehnke M, Clark AG, Eichler EE, Gibson G, Haines JL, Mackay TF, McCarroll SA, Visscher PM Finding the missing heritability of complex disease. *Nature*. 2009;461:747-53.
9. Blanchong CA, Chung EK, Rupert KL, Yang Y, Yang Z, Zhou B, Moulds JM, Yu CY. Genetic, structural and functional diversities of human complement components C4A and C4B and their mouse homologues, Sfp and C4. *Int Immunopharmacol*. 2001;1:365-92.
10. Niederer HA, Clatworthy MR, Willcocks LC, Smith KG. FcγRIIB, FcγRIIIB, and systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1183:69-88.
11. Kelley J, Johnson MR, Alarcón GS, Kimberly RP, Edberg JC. Variation in the relative copy number of the TLR7 gene in patients with systemic lupus erythematosus and healthy control subjects. *Arthritis Rheum*. 2007;56:3375-8.
12. Neill SO, Cervera R. Systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2010;24:841-55.
13. Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2008;358:929-39.
14. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982;25:1271-7.

15. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. [letter]. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1725.
16. Walport MJ. Complement and system lupus erythematosus. *Arthritis Res.* 2002;4:S279-S293.
17. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 2010;20:114-22.
18. Qu H, Ricklin D, Lambris JD. Recent developments in low molecular weight complement inhibitors. *Mol Immunol.* 2009;47:185-95.
19. Wagner E, Frank MM. Therapeutic potential of complement modulation. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9:43-56.
20. Walport MJ. Complement-part I. *N Engl J Med.* 2001;344:1058-66.
21. Carroll MV, Sim RB. Complement in health and disease. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63:965-75.
22. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris KD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol.* 2010;11:785-97.
23. Peterslund NA, Koch, C, Jensenius, JC, Thiel, S. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. *Lancet.* 2001;358:637-8.
24. Stuart LM, Takahashi K, Shi L, Savill J, Ezekowitz RA. Mannose-binding lectin-deficient mice display defective apoptotic cell clearance but no autoimmune phenotype. *J Immunol.* 2005;174:3220-6.

25. Selander B, Mårtensson U, Weintraub A, Holmström E, Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, Truedsson L, Sjöholm AG. Mannan-binding lectin activates C3 and the alternative complement pathway without involvement of C2. *J Clin Invest.* 2006;116:1425-34.
26. Harboe M, Mollnes TE. The alternative complement pathway revisited. *J Cell Mol Med.* 2008;12:1074-84.
27. Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrens TW. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity.* 2001;15:397-408.
28. Truedsson L, Bengtsson AA, Sturfelt G. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 2007;40:560-66.
29. Sjöholm AG, Jonsson G, Braconier JH, Sturfelt G, Truedsson L. Complement deficiency and disease: An update. *Mol Immunol.* 2006;43(1-2):78-85.
30. Walport MJ, Davies KA, Botto M. C1q and systemic lupus erythematosus. *Immunobiology.* 1998;119:265-85
31. Manderson AP, Botto M, Walport MJ. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Ann Rev Immunol.* 2004;22:431-56.
32. Gaboriaud C, Juanhuix J, Gruez A, Lacroix M, Darnault C, Pignol D, Verger D, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ. The crystal structure of globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties. *J Biol Chem.* 2003;278:46974-82.

33. Kishore U, Ghai R, Greenhough TJ, Shrive AK, Bonifati DM, Gadjeva MG, Waters P, Kojouharova MS, Chakraborty T, Agrawal A. Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. *Immunol Lett.* 2004;95:113-28.
34. Pettigrew HD, Teuber SS, Gershwin ME. Clinical significance of complement deficiencies. *Ann NY Acad Sci.* 2009;1173:108-23.
35. Belot A, Cimaz R. Monogenic forms of systemic lupus erythematosus: new insights into SLE pathogenesis. *Pediatr Rheumatol.* 2012;10(21):1-6.
36. Schejbel L, Skattum L, Hagelberg S, Ahlin A, Schiller B, Berg S, Genel F, Truedsson L, Garred P. Molecular basis of hereditary C1q deficiency-revisited: identification of several novel disease-causing mutations. *Genes Immun.* 2011;12:626-34.
37. Petry F, Loos M. Common silent mutations in all types of hereditary complement C1q deficiencies. *Immunogenetics.* 2005;57:566-71.
38. Yang Y, Lhotta K, Chung EK, Eder P, Neumair F, Yu CY. Complete complement components C4A and C4B deficiencies in human kidney diseases and systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2004;173:2803-14.
39. Rupert KL, Moulds JM, Yang Y, Arnett FC, Warren RW, Reveille JD, Myones BL, Blanchong CA, Yu CY. The molecular basis of complete C4A and C4B deficiencies in a systemic lupus erythematosus (SLE) patient with homozygous C4A and C4B mutant genes. *J Immunol.* 2002;169:1570-8.
40. Dodds AW, Ren, XD, Willis AC, Law SKA. The reaction mechanism of the internal thioester in the human complement component C4. *Nature.* 1996;379:177-9.

41. Wu YL, Hauptmann G, Viguier M, Yu CY. Molecular basis of complete complement C4 deficiency in two North-African families with systemic lupus erythematosus. *Genes Immun.* 2009;10:433-45.
42. Ittiprasert W, Kantachuvesiri S, Pavasuthipaisit K, Veraseritniyom O, Chaomthum L, Totemchokchayakarn K, Kitiyanant Y. Complete deficiencies of complement C4A and C4B including 2-bp insertion in codon 1213 are genetic risk factors of systemic lupus erythematosus in Thai populations. *J Autoimmun.* 2005;25:77-84.
43. Yang Y, Chung EK, Wu YL, Savelli SL, Nagaraja HN, Zhou B, Hebert M, Jones KN, Shu Y, Kitzmiller K. Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans. *Am J Hum Genet.* 2007;80:1037-54.
44. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med.* 2001;344:1140-4.
45. Yu CY. Molecular genetics of the human MHC complement gene cluster. *Exp Clin Immunogenet.* 1998;15:213-30.
46. Awdeh ZL, Raum DD, Glass D, Agnello V, Schur PH, Johnston RB Jr, Gelfand EW, Ballou M, Yunis E, Alper CA. Complement-human histocompatibility antigen haplotypes in C2 deficiency. *J Clin Invest.* 1981;67:581-3
47. Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency and apoptosis. *Adv Immunol.* 2000;76:227-324.

48. Truedsson L, Alper CA, Awdeh Z, Johansen P, Sjöholm AG, Sturfelt G. Characterization of type I complement C2 deficiency MHC haplotypes: strong conservation of the complotype/HLA-B-region and absence of disease association due to linked class II genes. *J Immunol.* 1993;151:5856-63.
49. Johnson CA, Densen P, Hurford RK Jr, Colten HR, Wetsel RA. Type I human complement C2 deficiency. A 28-base pair gene deletion causes skipping of exon 6 during RNA splicing. *J Biol Chem.* 1992;267:9347-53.
50. Wetsel RA, Kulics J, Lokki ML, Kiepiela P, Akama H, Johnson CA, Densen P, Colten HR. Type II human complement C2 deficiency. Allele-specific amino acid substitutions (Ser189 --> Phe; Gly444 --> Arg) cause impaired C2 secretion. *J Biol Chem.* 1996;271:5824-31.
51. Zhu ZB, Atkinson TP, Volanakis JE. A novel type II complement C2 deficiency allele in an African-American family. *J Immunol.* 1998;161:578-84.
52. Jesus AA. *Investigação de imunodeficiências primárias em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011. 148p.
53. Den Dunne JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutant.* 2000;15:7-12 .
54. Rafiq S, Frayling TM, Vyse TJ, Cunninghame Graham DS, Eggleton P. Assessing association of common variation in the C1Q gene cluster with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2010;161:284-9.

55. Petry F. Molecular basis of hereditary C1q deficiency. *Immunobiology*. 1998;199:286-94.
56. Sun-Tan C, Ozgur TT, Kilinc G, Topaloglu R, Gokoz O, Ersoy-Evans S et al. Hereditary C1q deficiency: a new family with C1q deficiency. *Turk J Pediatr*. 2010;52:184-6.
57. Namjou B, Keddache M, Fletcher D, Dillon S, Kottyan L, Wiley G, Gaffney PM, Wakeland BE, Liang C, Wakeland EK, Scofield RH, Kaufman K, Harley JB. Identification of novel coding mutation in C1qA gene in an African-American pedigree with lupus and C1q deficiency. *Lupus*. 2012;21:1113-8.
58. Vicent F, De La Salle H, Bohbot A, Bergerat JP, Hauptmann G, Oberling F. Synthesis and regulation of complement components by human monocytes/macrophages and by acute monocytic leukemia. *DNA Cell Biol*. 1993;12:415-23.
59. Lappin DF, Birnie GD, Whaley K. Modulation by interferons of the expression of monocyte complement genes. *Biochem J*. 1990;268:387-92.
60. Carneiro-Sampaio M, Liphaus BL, Jesus AA, Silva CAA, Oliveira JB, Kiss MH. Understanding Systemic Lupus Erythematosus Physiopathology in the Light of Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol*. 2008;28(Suppl 1):S34-S41.
61. Truedsson L, Sturfelt G, Nived O. Prevalence of the type I complement C2 deficiency gene in Swedish systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 1993;2:325-7.
62. Jesus AA, Liphaus BL, Silva CA, Bando SY, Andrade LE, Coutinho A, Carneiro-Sampaio M. Complement and antibody primary immunodeficiency in juvenile systemic lúpus erythematosus patients. *Lupus*. 2011;20:1275-84.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo I – Termo de consentimento livre e esclarecido

Anexo II - Artigo submetido ao Annals of the Rheumatic Diseases

Anexo III – Resumo apresentado no 1st São Paulo Advanced School on Primary Immunodeficiencies: Unravelling Human Immune Physiology

Anexo IV – Resumo apresentado no Congresso Europeu de Reumatologia (EULAR) em 2011.

Anexo V- Resumo apresentado no III Simpósio Internacional de Imunodeficiências Primárias em 2011

Anexo VI- Resumo aceito para apresentação no Congresso Europeu de Reumatologia (EULAR) em 2013.

Anexo I – Termo de consentimento livre e esclarecido

HC HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

URGENTE

Ao
Departamento de Pediatria

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 03.03.10, tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº 1059/09 intitulado: **"Banco de dados clínicos-laboratoriais e repositório de amostras biológicas de crianças e adolescentes portadores de doenças auto-imunes e imunodeficiências primárias"**, aprovado por esta Comissão em 02.12.10, contempla o sub-projeto intitulado **"Investigação de mutações das frações C1q, C4 e C2 do sistema complemento em pacientes pediátricos com lúpus eritematoso sistêmico"**, que será dissertação de mestrado da aluna **NATÁLIA UMETSU SOBRINHO**.

Pesquisadora Responsável: **DRA BERNARDETE DE LOURDES LIPHAUS**

CAPPesq, 03 de março de 2010.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCTMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Orlando Pereira Campos, 225, 5º andar - CEP 05400-070 - São Paulo - SP
Fones: 011 - 30896-642 Fax: 011 - 3069-6492 - e-mail: cappec@fmed.usp.br
6500

Anexo II – Artigo submetido ao Annals of the Rheumatic Diseases

Dear Dr. Liphaus,

Your manuscript entitled "Molecular Characterization of Primary C1q Deficiency in a Brazilian Patient with Juvenile Systemic Lupus Erythematosus" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Annals of the Rheumatic Diseases.

Your manuscript ID is annrheumdis-[2013-203975](#).

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/ard> and edit your user information as appropriate.

Please check that all author names are correctly entered as this will be the name displayed in any PubMed search.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/ard>.

We are constantly trying to find ways of improving the peer review system and continually monitor processes and methods by including article submissions and reviews in our research. If you do not wish your paper or review entered into our peer review research programme, please let us know by emailing ard@bmjgroup.com as soon as possible.

Thank you for submitting your manuscript to Annals of the Rheumatic Diseases

Kind regards,

Editor Annals of the Rheumatic Diseases

Running title: primary C1q deficiency in Juvenile SLE

Brief Paper

Molecular Characterization of Primary C1q Deficiency in a Brazilian Patient with Juvenile Systemic Lupus Erythematosus

Umetsu N¹, Liphaus BL¹, Bando SY¹, Jesus AA¹, Silva CA^{1,2}, Carneiro-Sampaio M.¹

¹Children's Hospital, ²Disciplina de Reumatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Key words: complement system; C1q component; silent mutation; no coding region; juvenile systemic lupus erythematosus

Correspondence and reprint requests to: Dra Bernadete de Lourdes Liphaus, Instituto da Criança, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 647, CEP 05403-900, São Paulo-SP, Brazil, phone: 55-11-26618606

e-mail:Bernadete.liphaus@hc.fm.usp.br

Financial support: FAPESP grant 08/58238-4

Discloses: None

ABSTRACT

Background. We performed the molecular characterization of C1q gene in a patient with C1q deficiency and Juvenile-onset Systemic Lupus Erythematosus (JSLE). **Methods.** All exons of A, B and C chains of C1q gene were sequenced. Peripheral blood mononuclear cells were cultivated and stimulated with interferon gamma. Quantitative real-time PCR assay was performed to evaluate mRNA expression of C1qA, B and C chains. **Results.** Sequencing of C1q gene revealed heterozygous silent mutations in A chain (c.276 A>G Gly) and in C chain (c.126 C>T Pro). Additionally, two homozygous single-base exchanges were observed in the no coding regions 5'UTR (c. -159 T>G) and 3'UTR (c*78 A>G) in B chain. Furthermore, patient's healthy mother C1q gene was also sequenced and showed the same homozygous silent mutation in A chain, heterozygous silent mutation in C chain and single-base exchanges in B chain. In addition, patient's mother had a missense mutation in A chain (c.295 A>C Ile>Leu). Quantitative RT-PCR revealed that patient's C1qA gene mRNA expression without stimulation was 1.3 times decreased and after interferon gamma stimulation was 1.6 times more expressed compare with healthy samples. C1qB gene expression without stimulation was 2.2 times decreased and after stimulation was 1.5 times more expressed. Healthy controls did not expressed C1qC gene and patient had low expression without and with stimulation. **Conclusions.** We speculate whether the homozygous single-base exchanges observed in the no coding regions 5'UTR (promoter region) and 3'UTR (stabilization mRNA region) in B chain and the silent mutations, could modify mRNA transcription, as its expression was decreased without stimulation. Further protein and regulation analyzes will be necessary to relate C1q gene variations and undetectable serum C1q levels in patients with JSLE.

Anexo III - Resumo apresentado no 1st São Paulo Advanced School on Primary Immunodeficiencies: Unravelling Human Immune Physiology

São Paulo Advanced School on Primary Immunodeficiencies: Unraveling Human Immuno-Physiology

Program: November 28th (Sunday) - December 4th (Saturday)

December 2nd (Thursday)

08:30h	Lecture (joint session with "Comissão de Pesquisa da FMUSP"):
AIRE - Diane Mathis (USA)
Coordinator: Geraldo Passos and Durval Damiani (Brazil)
Presentation and discussion of PID clinical cases:
Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED) due to AIRE mutation: the prototype of central tolerance defects - Mayra B. Dorna (Brazil)
10:00h	Coordinator: Diane Mathis (USA)
10:00 - 10:30h	Coffee break
10:30h	Lecture:
Molecular Bases for Autoimmunity in Down Syndrome - Magda Carneiro-Sampaio (Brazil)
Coordinator: Antonio Coutinho (Portugal)
	Presentation and discussion of PID clinical cases:
DiGeorge syndrome associated to 22q11.2 deletion: a defect of thymus development - presentation of a series - Angela Bueno Fomin (Brazil)
12:00h	Coordinator: Esper Kallas (Brazil)
12:00 - 13:30h	Lunch and poster view
13:30h	Lecture:
Complement Deficiencies - Luis Eduardo Coelho Andrade (Brazil)
Coordinator: Wilmar Dias-da-Silva (Brazil)
	Presentation and discussion of PID clinical cases:
Homozygous C1q deficiency: the strongest single factor for developing SLE - Natalia Umetu (Brazil)
Hereditary Angioedema - Maria Fernanda Ferraro (Brazil)
15:30 h	Coordinator - Luiza Karla Arruda and Virginia Ferriani (Brazil)
15:30 - 16:00h	Coffee break
	Lecture:
Control of promiscuous gene expression in the thymus - Geraldo Passos (Brazil)
	Presentation and discussion of PID clinical cases:
FOXP1 deficiency - Isabel Esteves (Portugal)
Comments: Mouse models of thymic deficiencies - Jocelyne Demengeot (Portugal)
18:00h	Coordinator - Jocelyne Demengeot (Portugal)

Anexo IV – Resumo apresentado no Congresso Europeu de Reumatologia (EULAR) em 2011.

[2011] [AB0024] SILENT MUTATIONS AND POLYMORPHISMS IN THE 5'UTR AND 3'UTR OF C1QB GENE IN A BRAZILIAN PATIENT WITH JUVENILE SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS (JSLE)

N. Umetsu, B.L. Liphau, S.Y. Bando, A.A. Jesus, M. Carneiro-Sampaio Pediatrics Department, Children's Hospital-FMUSP, São Paulo, Brazil

Citation: Ann Rheum Dis 2011;70(Suppl3):686

Basic science in paediatric rheumatology

Medical or Research Professionals / Clinicians - Abstract Submission

Basic Science in paediatric rheumatology

EULAR11-5277 SILENT MUTATIONS AND POLYMORPHISMS IN THE 5'UTR AND 3'UTR OF C1QB GENE IN A BRAZILIAN PATIENT WITH JUVENILE SYSTEMIC LUPUS

ERYTHEMATOSUS (JSLE) N. Umetsu ¹, B. L. Liphau ^{1,*}, S. Y. Bando ¹, A. A. Jesus ¹, M. Carneiro-Sampaio ¹ ¹Pediatrics Department, Children's Hospital-FMUSP, São Paulo, Brazil

I confirm that my abstract complies with the rules and contains original data: Yes My abstract has been or will be presented at a scientific meeting during a 12 months period prior to EULAR 2011:

No Are you applying for a Travel Bursary?: Yes Background: C1q complement component is not only associated with complement activation, immune complex removal but also with the binding to apoptotic cells. Although, C1q deficiency is a rare genetic disorder it is strongly associated with lupus development. Objectives: To present a Brazilian lupus patient with C1q deficiency and mutations in the C1q gene. Methods: All exons including the promoter region and the splice site of C1q A, B and C genes were sequenced. Results: A Brazilian 10-year-old girl was diagnosed with JSLE 4 years ago due to presence of malar rash, membranous glomerulonephritis, anti-dsDNA and ANA. Her complement components dosage showed C1q level equal zero, low C4 and normal C3 level. The genetic evaluation revealed heterozygous silent mutations within the C1qA gene in the position c.276A>T and in the C1qC gene in the site c.126C>T. Additionally, two homozygous polymorphisms were observed in the 5'UTR (c.-160T>G) and 3'UTR (c*75A>G) of C1qB gene. Furthermore, her mother presented: 1- the same silent mutation in the C1qA gene though in homozygous; 2- the same heterozygous silent mutation in the C1qC gene, 3- the same polymorphisms in the C1qB gene and 4- an additional missense heterozygous mutation in the C1qA gene (c.295A>C; Ile>Leu). Conclusions: We speculate whether the polymorphism in the promoter 5'UTR of C1qB gene may modify mRNA transcription and the polymorphism in the 3'UTR may interfere in the mRNA stabilization, resulting in C1q deficiency. Further analysis are been conducted to clarify the role of these polymorphisms in C1q deficiency. Our findings may suggest that not only homozygous and heterozygous mutations but also polymorphisms in the untranslated region may be related to C1q deficiency and lupus development. References: 1- Rafiq S, Frayling TM, Vyse TJ, Cunnninghame-Graham DS, Eggleton P. Assessing association of common variation in the C1q gene cluster with systemic lupus erythematosus. Clin Exp Immunol. 2010; 161:284-9; 2- Metha P, Norsworthy PJ, Hall AE, Kelly SJ, Walport MJ, Botto M, Pickering MC. SLE with C1q deficiency treated with frozen plasma: a 10-year experience. Rheumatology 2010; 49:823-4; 3- Marquat HV, Schejbel L, Sjöholm A, Martensson U, Nielsen S, Koch A, Svejgaard A, Garred P. C1q deficiency in an Inuit family: Identification of a new class C1q disease- causing mutations. Clin Immunol. 2007; 124:33-40.

Disclosure of Interest: None Declared

Anexo V – Resumo apresentado no III Simpósio Internacional de Imunodeficiências Primárias em 2011

LABORATORIAL INVESTIGATION 22:

Molecular analysis of C2 complement component in two pediatric patients with systemic lupus erythematosus (SLE)

Umetsu, N; Liphaus, BL; Bando, SY; Jesus, AA; Silva, CAA; Carneiro-Sampaio, M

Departamento de Pediatria da FMUSP /LIM-36

Introduction: C2 deficiency (C2D) is the most common complement genetic disorder and more than half of C2D individuals present with SLE, SLE-Like, glomerulonephritis and vasculitis. Type I C2D (28bp deletion) is caused by a deletion that removes 9bp of the 3'-end of exon 6 and 19bp of the 5'-end of intron 6, leading to a premature stop codon, that results in deletion of exon 6 and failure to C2 synthesis.

Objective: To evaluate the molecular basis and expression of C2 gene in two pediatric patients with SLE and low C2 levels.

Methods: Serum level of C2 were determined by radial immunodiffusion and immunohemolysis. All exons of C2 gene of the male patient were sequenced. The type I C2D was determined in the female patient by qualitative PCR and sequenced. The C2 DNA from patients were sequenced and compared with the GeneBank sequence (accession number NG_011730). Lymphocytes from peripheral blood were cultivated, stimulated with 100 U/ml IFN- γ , incubated for 36 hours and a qualitative RT-PCR was realized to verify C2 gene mRNA expression.

Results: The boy was diagnosed with lupus at 9-years-old due to presence of malar rash, photosensitivity, seizures, serositis, nephritis and positive anti-dsDNA. During the follow-up he had 3 episodes of pneumonia. His C2 dosage was equal to 6.0 mg/L. The C2 gene sequence aligning present 100% of match with the GeneBank sequence and C2 mRNA was expressed with or without stimulation.

The girl was diagnosis with lupus at 6-years-old due to presence of photosensitivity, serositis, nephritis, lymphopenia and positive anti-dsDNA. She had one episode of cytomegalovirus infection. Her C2 dosage was equal to 3.4 mg/L. The genetic evaluation revealed a heterozygous 28bp deletion at exon 6. However C2 mRNA expression was observed with or without stimulation.

Conclusion: The presence of a heterozygous type I C2D in the girl patient was compatible with the diagnosis of primary C2D that is probably related with SLE development. However it will be necessary to evaluate the quantity of mRNA in the boy and in the girl.

Anexo VI – Resumo aceito para apresentação no Congresso Europeu de Reumatologia (EULAR) em 2013.

Medical or Research Professionals/Clinicians Topic area: Basic and

translational research Specific topic: 10. Basic science in paediatric rheumatology

EULAR13-2028 MOLECULAR CHARACTERIZATION OF COMPLEMENT C1Q, C2, AND C4 GENES IN JUVENILE SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS B. L. Liphaus ^{1,*}, N. Umetsu ¹, S. Bando ¹, A. A. Jesus ¹, L. E. C. Andrade ², C. A. Silva ¹, M. Carneiro-Sampaio ¹ ¹Pediatrics, Instituto da Criança - Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo, ²Rheumatology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

My abstract has been or will be presented at a scientific meeting during a 12 months period prior to EULAR 2013:

No Is the first author applying for a travel bursary?: No Is the first author of this abstract an undergraduate medical student?: No Background: It was not already defined whether standard measures are sufficient to assess primary C1q, C2 and C4 deficiencies¹⁻³. Objectives: To perform C1q, C2 and C4 molecular characterization in Juvenile Systemic Lupus Erythematosus (JSLE) patients. Methods: From JSLE cohort screened for complement deficiencies² were selected P1 with undetectable C1q and normal C3 and C4; P2 with decreased C2 and C4; P3 with decreased C2, normal C3 and C4 and P4 with repeated decreased C4, normal C1q, C2 and C3. Primers were according to GenBank. Peripheral mononuclear cells from patients and 3 healthy controls were cultivated, stimulated with interferon gamma, incubated for 36 h and quantitative RT-PCR verified gene mRNA expression. Results: C1q characterization (P1) revealed heterozygous silent mutations in A chain (c.276 A>G Gly) and C chain (c.126 C>T Pro). Two homozygous single-base exchanges were found in 5'UTR (c. -159 T>G) and 3'UTR (c*78 A>G) in B chain. Patient's healthy mother had the same homozygous silent mutation in A chain, heterozygous silent mutation in C chain and single-base exchanges in B chain. She also had missense mutation in A chain (c.295 A>C Ile>Leu). Quantitative RT-PCR showed that (P1) C1qA gene mRNA expression without stimulation was 1.3 times decreased and with interferon gamma was 1.6 times more expressed compare with healthy samples. C1qB gene expression without stimulation was 2.2 times decreased and stimulated was 1.5 times increased. Controls did not express C1qC and patient had low expression without and with stimulation. P2 and P3 had heterozygous C2 deficiency type I (28 bp deletion) and P2 also had 2 copies of C4A and 1 of C4B. The sequencing showed that exons, splicing sites, 5'UTR and 3'UTR matched 100% with reference sequence, exception to 28bp deletion. Patients' mRNA expressions without stimulation was 23 times decreased and with interferon was 4.2 times decreased compare to controls. P4 had 2 copies of C4A and 3 of C4B and RT-PCR showed that C4B expression without stimulation was 14 times decreased and with interferon was 1.1 times increased. The C4A gene expression was not performed. Conclusions: We speculate whether single-base exchanges in 5'UTR in B chain, that correspond to promoter region, and in 3'UTR, that correspond to stabilization mRNA region, may have modified the transcription as its expression was decreased without stimulation. Further analyzes may relate C1q gene variations and undetectable C1q. In addition, heterozygous C2 deficiency type I led to reduced mRNA expression and may be present in JSLE patients with detectable C2 levels. Finally, C4B gene expression was decreased and shows that serum dosage and gene copy number may not be sufficient to assess C4 deficiency. References: 1-Carneiro-Sampaio M, et al. Understanding Systemic Lupus Erythematosus Physiopathology in the Light of Primary Immunodeficiencies. J Clin Immunol. 2008;28:S34-S41; 2-Jesus AA, et al. Complement and antibody primary immunodeficiency in juvenile systemic lupus erythematosus patients. Lupus 2011;20:1275-84; 3-Boeckler P, et al. Which complement assays and typings are necessary for the diagnosis of complement deficiency in patients with lupus erythematosus? A study of 25 patients. Clin Immunol. 2006;121:198-202. Financial support: FAPESP grant 2008/58238-4. Disclosure of Interest: None Declared