

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA

PAOLA PINHEIRO KAHWAGE

**Avaliação do gene *SPATA5L1* e sua expressão renal no lúpus eritematoso sistêmico de início na infância**

Ribeirão Preto

2023

PAOLA PINHEIRO KAHWAGE

**Avaliação do gene *SPATA5L1* e sua expressão renal no lúpus eritematoso sistêmico de início na infância**

**Versão Corrigida**

Tese apresentada ao Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente  
Opção: Investigação em Pediatria

Orientadora: Dra. Luciana Martins de Carvalho

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação

Serviço de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Kahwage, Paola Pinheiro

Avaliação do gene *SPATA5L1* e sua expressão renal no lúpus eritematoso sistêmico de início na infância – Ribeirão Preto, 2022.

87 p

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -  
Universidade de São Paulo.

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Opção: Investigação em Pediatria.

Versão Original

Orientador: Luciana Martins de Carvalho.

Descritores: 1. SPATA5L1 2. lúpus eritematoso sistêmico 3.  
criança 4. nefrite lúpica.

Nome: KAHWAGE, Paola Pinheiro.

Título: Avaliação do gene SPATA5L1 e sua expressão renal no lúpus eritematoso sistêmico de início na infância

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Aprovada em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_

A meus filhos Isabela e Felipe, por tornarem  
minha vida mais feliz através do conhecimento  
do amor verdadeiro.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua infinita bondade, pelas oportunidades e desafios que me são ofertados diariamente para minha evolução pessoal, por estar comigo sempre, dando-me força e esperança nos momentos de aflição e por me proporcionar muitos momentos de alegria e amor, mostrando-me a beleza da vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Luciana Martins de Carvalho, pela oportunidade de fazer parte desse projeto desafiador, por confiar no meu trabalho como médica e pesquisadora e pelo jeito amoroso, paciente e compreensivo com que me orienta e transmite todo seu conhecimento.

À Profa. Dra. Virgínia Paes Leme Ferriani, que me recebeu de braços abertos quando eu comecei a residência em reumatologia pediátrica no HCRP, por me convidar para fazer parte desta equipe tão especial, a qual componho com muito orgulho e gratidão, por me preparar para o doutorado através de sua excelente orientação no mestrado, e por me aceitar mais uma vez como aluna de doutorado enquanto a minha atual orientadora estava impossibilitada.

A toda equipe de reumatologia pediátrica do HC criança, em especial, Dr. Hugo, Dra. Luísa e Dra. Fernanda, por “segurarem a barra” nos ambulatórios, possibilitando que eu me dedicasse com mais intensidade a esse projeto, compreendendo minhas limitações e dificuldades, principalmente no final deste ano.

À equipe do laboratório de pediatria do HCFMRP-USP, composta por Rosane, Veridiana, Luciana e, especialmente, Graziela, que foram essenciais neste trabalho, através de toda ajuda com os experimentos laboratoriais e pela paciência em tirar minhas inúmeras dúvidas sobre esse mundo novo.

Ao Dr. Fabiano, médico patologista do HCRP, que me auxiliou gentilmente durante a avaliação das lâminas das biópsias renais.

À Paula Sandrin-Garcia e Ronald Moura, geneticistas de extrema competência, por sempre estarem disponíveis a ajudar na parte genética deste estudo, e por me fazerem entender de maneira fácil e clara esse mundo a parte que é a genética.

Ao meu marido Rafael, por aceitar estar ao meu lado nesta caminhada, dividindo as provas da vida, multiplicando as alegrias, por acreditar e me incentivar na realização dos meus sonhos, pelo amor e carinho do dia a dia, e por toda ajuda e compreensão nos momentos de desespero.

Aos meus pais Pedro e Consuelo, por terem me dado a oportunidade de viver, por me ajudarem a ser quem sou hoje, por me proporcionarem condições de eu chegar onde cheguei através de todo apoio financeiro e emocional, mas principalmente à minha mãe Consuelo, pelo sacrifício, dedicação e suporte presencial nos momentos de maior dificuldade, possibilitando melhores condições para o término desta tese.

À minha funcionária Jani, por cuidar da minha casa e dos meus filhos, para que eu pudesse me dedicar com maior atenção a este projeto.

À minha cunhada Tharuell, que se tornou uma verdadeira amiga aqui em Ribeirão Preto, por me dar suporte técnico durante a execução desta obra.

À minha psicóloga Karina, por me ajudar no meu autoconhecimento e equilíbrio emocional, por me mostrar a luz nos momentos de escuridão e por me trazer de volta ao meio eixo de maneira tão amorosa.

À CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À FAEPA. O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da FMRP-USP – Número do Financiamento 1497/2019.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

**Madre Teresa de Calcutá**



## RESUMO

KAHWAGE, Paola Pinheiro. **Avaliação do gene *SPATA5L1* e sua expressão renal no lúpus eritematoso sistêmico de início na infância.** 2022. Tese (Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

**Introdução:** Genes relacionados à suscetibilidade no lúpus eritematoso sistêmico (LES) estão sendo estudados para avaliar sua contribuição na nefrite lúpica (NL). Estudo prévio observou alta expressão renal da proteína SPATA5L1 em paciente com nefrite *full-house*, associada a uma variante *missense* no gene. **Objetivo:** Determinar a frequência de variantes no gene *SPATA5L1* e a sua expressão renal no lúpus eritematoso sistêmico de início na infância (LESc). **Métodos:** Foi realizado um estudo transversal observacional em pacientes com diagnóstico de LESC acompanhados nos ambulatórios de Reumatologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Foram avaliados retrospectivamente os prontuários médicos para caracterização demográfica e clínica dos pacientes e histológica das biópsias renais. Os índices de atividade SLEDAI-2k e BILAG e de cronicidade SLICC foram utilizados para avaliação do paciente no momento das biópsias renais. Na primeira fase do estudo, foi realizado o sequenciamento do gene *SPATA5L1* utilizando *primers* para a identificação de possíveis variantes. Na segunda fase, foi realizada a avaliação da expressão proteica do SPATA5L1 por imunohistoquímica em biópsias renais com semiquantificação da intensidade de imunomarcção. A modelagem da proteína SPATA5L1 e sua dinâmica molecular foram realizadas quando encontradas variantes de potencial patogênico. Para comparação dos resultados de expressão renal da proteína, foram utilizadas amostras de biópsias renais de pacientes com diagnóstico de síndrome nefrótica idiopática da infância (SNI) e amostras de biópsias renais de rins normais. Para avaliação de associações, foi utilizado o teste *t de Student*, ANOVA e a correlação de Spearman considerando nível de significância de 5%. **Resultados:** Dos 45 pacientes avaliados, um (2,2%) apresentou uma variante do tipo *missense* no exon 5 do gene *SPATA5L1* (rs16943025) e demonstrou maior estabilidade da proteína mutante em relação à proteína nativa em estudos de dinâmica molecular. Vinte e cinco pacientes (55,5%) apresentaram um polimorfismo intrônico (rs12440038). Um participante (2,2%) apresentou um polimorfismo intrônico inédito em heterozigose (A>G). Todas as amostras de tecido renal com NL (29) e SNI (8) apresentaram aumento da expressão da proteína SPATA5L1 tanto em glomérulos

quanto em túbulos quando comparadas com as amostras de tecidos renais normais (4) ( $p < 0,01$ ), sem diferença estatística entre elas. Houve correlação positiva na relação entre proteína creatinina na amostra urinária e a expressão da proteína nos túbulos renais ( $p < 0,01$ ), mas não em glomérulos. Não foram encontradas associações da intensidade de expressão da proteína SPATA1 com provas de atividade inflamatória, índices de SLEDAI-2k e BILAG, *clearance* de creatinina, classe histológica da NL, níveis de proteinúria nefrótica e índice de atividade e cronicidade da biópsia renal. **Conclusão:** A proteína SPATA5L1 tem expressão aumentada na NL e SNI em relação ao controle. Houve correlação positiva entre a relação proteína creatinina na amostra urinária e a expressão da proteína nos túbulos renais. Apenas um paciente apresentou mutação missense no gene, não sendo possível correlacionar com o início ou gravidade da doença.

Palavras-chave: *SPATA5L1*, lúpus eritematoso sistêmico, criança, nefrite lúpica

## ABSTRACT

KAHWAGE, Paola Pinheiro. **Evaluation of the *SPATA5L1* gene and its renal expression in childhood-onset systemic lupus erythematosus.** 2022. 2022. Tese (Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

**Introduction:** Genes related to contribution to systemic lupus erythematosus (SLE) are being studied to assess their contribution in lupus nephritis (LN). A previous study observed high renal expression of the SPATA5L1 protein in a patient with full-house nephritis, associated with a missense variant in the gene. **Objective:** To determine the frequency of *SPATA5L1* gene variants and their renal expression in childhood-onset systemic lupus erythematosus (cSLE). **Methods:** A cross-sectional observational study was carried out in patients diagnosed with cSLE followed at the Pediatric Rheumatology outpatient clinics of the Clinical Hospital of the Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo. Medical records were retrospectively evaluated for demographic and clinical characterization of patients and histological characterization of renal biopsies. The SLEDAI-2k and BILAG activity indices and the SLICC chronicity index were used to assess the patient at the time of renal biopsies. In the first phase of the study, the *SPATA5L1* gene was sequenced using primers to identify possible variants. In the second phase, the evaluation of SPATA5L1 protein expression was performed by immunohistochemistry in kidney biopsies with semi-quantification of immunostaining intensity. Modeling of the SPATA5L1 protein and its molecular dynamics was performed when variants of pathogenic potential were found. To compare the results of the protein renal expression, samples of renal biopsies from patients diagnosed with childhood idiopathic nephrotic syndrome (INS) and samples of renal biopsies from normal kidneys were used. To assess associations, Student's t test, ANOVA and Spearman's correlation were used considering a significance level of 5%. **Results:** Forty-five patients were evaluated. One patient (2.2%) had a missense variant in exon 5 of the *SPATA5L1* gene (rs16943025) and demonstrated greater stability of the mutant protein compared to the wild protein in molecular dynamics studies. Twenty-five patients (55.5%) had an intronic polymorphism (rs12440038). One participant (2.2%) had a new intronic polymorphism in heterozygosity (A>G). All samples of renal tissue with LN (29) and INS (8) showed increased expression of the SPATA5L1 protein both in glomeruli and in tubules when compared with samples of normal renal tissues (4) ( $p<0.01$ ), without statistical difference between them.

There was a positive correlation between the creatinine protein ratio in the urinary sample and protein expression in renal tubules ( $p < 0.01$ ), but not in glomeruli. No associations were found between SPATAL1 protein expression intensity and inflammatory activity tests, SLEDAI-2k and BILAG indices, creatinine clearance, NL histological class, nephrotic proteinuria levels, and activity index and chronicity of the renal biopsy. **Conclusion:** SPATA5L1 protein has increased expression in LN and INS compared to control. There was a positive correlation between the creatinine protein ratio in the urinary sample and protein expression in the renal tubules. Only one patient had a missense mutation in the gene, and it was not possible to correlate it with the onset or severity of the disease.

Keywords: *SPATA5L1*, systemic lupus erythematosus, childhood, lupus nephritis

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Critérios classificatórios utilizados para o diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico .....	20
<b>Tabela 2:</b> Classificação da nefrite lúpica da <i>International Society of Nephrology/Renal Pathology Society</i> 2003 .....	23
<b>Tabela 3:</b> Primers utilizados para o sequenciamento dos exons do gene SPATA5L1 .....	38
<b>Tabela 4:</b> Características demográficas, clínicas e laboratoriais, ao diagnóstico, dos 45 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância, atendidos nos ambulatórios de reumatologia pediátrica de janeiro de 2019 a fevereiro de 2020 .....	43
<b>Tabela 5:</b> Classificação das biópsias renais realizadas pelos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância, atendidos nos ambulatórios de reumatologia pediátrica de janeiro de 2019 a fevereiro de 2020 .....	44
<b>Tabela 6:</b> Características demográficas, clínicas e laboratoriais, no momento da realização da biópsia renal, dos seis pacientes com síndrome nefrótica idiopática da infância, utilizados como grupo controle para avaliação da expressão renal da proteína. ....	44
<b>Tabela 7:</b> Comparação entre as amostras renais de nefrite lúpica, síndrome nefrótica e rins normais em relação à expressão da proteína SPATA5L1 nos túbulos e glomérulos .....	50
<b>Tabela 8:</b> Correlações entre as variáveis de marcadores inflamatórios (PCR e VHS) e SLEDAI-2K com a expressão da proteína SPATA5L1 nos túbulos e glomérulos dos pacientes com nefrite lúpica. ....	51
<b>Tabela 9:</b> Comparação entre as categorias A, B e C do índice de atividade de doença BILAG em relação à expressão da proteína SPATA5L1 nos túbulos e glomérulos dos tecidos renais de pacientes com nefrite lúpica. ....	52
<b>Tabela 10:</b> Avaliação das variáveis laboratoriais e histológicas relacionadas ao rim em relação à expressão da proteína SPATA5L1 nos túbulos e glomérulos dos tecidos renais de pacientes com nefrite lúpica .....	53

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Fisiopatologia do Lúpus Eritematoso Sistêmico .....	24
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática descrevendo genes e localizações cromossômicas previamente identificadas como implicadas no lúpus eritematoso sistêmico .....	25
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática descrevendo genes e localizações cromossômicas previamente identificadas como implicadas no lúpus monogênico. ....	27
<b>Figura 4:</b> Rede de interações proteína-proteína estabelecida pela proteína do gene SPATA5L1 e enriquecimento das proteínas da rede de interações proteína-proteína com SPATA5L1 .....	30
<b>Figura 5:</b> Representação da visualização em gel de agarose 2% dos produtos de PCR amplificados dos exons gerados do gene <i>SPATA5L1</i> , oriundos dos pacientes com SLEc.....	35
<b>Figura 6:</b> Organograma do desenho de estudo do projeto de pesquisa intitulado Avaliação do gene SPATA5L1 e sua expressão renal no lúpus eritematoso sistêmico .....	42
<b>Figura 7:</b> Avaliação da expressão do gene SPATA5L1 obtida de material disponível em bancos de dados públicos .....	46
<b>Figura 8:</b> Raiz quadrada do desvio médio (RMSD) da proteína SPATA5L1 do tipo nativo ( <i>wild type</i> ) e mutante (S273C e N592D) durante a simulação da dinâmica molecular.....	47
<b>Figura 9:</b> Estrutura da proteína SPATA5L1 feita através de modelagem molecular.....	48
<b>Figura 10:</b> Figura representativa da expressão da proteína SPATA5L1 em amostras de tecidos renais com síndrome nefrótica (A), nefrite lúpica (B) e rim normal (C) .....	50
<b>Figura 11:</b> Correlação entre o nível de relação proteína e creatinina na amostra de urina e a expressão da proteína SPATA5L1 observada nos túbulos das biópsias renais dos pacientes com nefrite lúpica .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACR	American College of Rheumatology
AFG2B	ATPase family gene 2 B
ANA	Anticorpo antinuclear
Anti-DNA	Antiácido desoxido ribonucleico
Anti-Sm	Anti-Smith
BILAG	British Isles Lupus Assessment Group
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EULAR/ACR	European League against Rheumatism/ American College of Rheumatology
GN	Glomerulonefrite
GWAS	Genome-wide association studies
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.
HLA	Antígeno antileucocitário humano
IF	Imunofluorescência
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
ISN/RPS	International Society of Nephrology/Renal Pathology Society
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LESc	Lúpus eritematoso sistêmico de início na infância
ME	Microscopia eletrônica
MO	Microscopia ótica
NET	Neutrophil extracellular traps
NL	Nefrite lúpica
PCR	Proteína C reativa
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SLEDAI-2K	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000
SLICC	Systemic Lupus International Collaboration Clinics

SLICC/ACR-DI	Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index
SNI	Nefrótica idiopática da infância
SNPs	Polimorfismos de base única
SPATA5L1	Spermatogenesis Associated 5 Like 1
TGF $\alpha$	Taxa de filtração glomerular estimada
VHS	Velocidade de hemossedimentação



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1.1 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO .....	18
1.1.1 <i>Lúpus Eritematoso Sistêmico de início na infância</i> .....	21
1.1.2 <i>Nefrite Lúpica</i> .....	22
1.1.3 <i>Fisiopatologia do Lúpus Eritematoso Sistêmico e Nefrite Lúpica</i> .....	22
1.1.4 <i>Fatores genéticos</i> .....	24
1.2 GENÉTICA X RIM.....	27
1.3 <i>SPATA5L1</i> .....	29
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>31</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
<b>4 PACIENTES E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
4.1. DESENHO DO ESTUDO .....	33
4.2. PARTICIPANTES .....	33
4.4 ASPECTOS ÉTICOS .....	34
4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	34
4.6 AVALIAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS.....	35
4.7 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO DNA .....	36
4.8 SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>SPATA5L1</i> .....	36
4.9 EXPRESSÃO PROTEICA DO <i>SPATA5L1</i> POR IMUNOHISTOQUÍMICA .....	38
4.10 ANÁLISES IN SÍLICO.....	39
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA .....	42
5.2 FREQUÊNCIA DE VARIANTES DO GENE <i>SPATA5L1</i> .....	44
5.4 MODELAGEM E DINÂMICA MOLECULAR DA PROTEÍNA MUTANTE <i>SPATA5L1</i> .....	45
5.5 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DAS VARIANTES NO GENE <i>SPATA5L1</i> NOS PACIENTES COM LES <sub>c</sub> COM A GRAVIDADE DO LÚPUS E DA NEFRITE LÚPICA E COM INÍCIO PRECOCE (PRÉ-PUBERAL) DA DOENÇA.....	49

5.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SPATA5L1 EM GLOMÉRULOS E TÚBULOS DE PACIENTES LÚPICOS COM NEFRITE LÚPICA, EM RIM NORMAL E EM PACIENTES COM SÍNDROME NEFRÓTICA. ....	49
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO 1 - CRITÉRIOS DO AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY PARA A CLASSIFICAÇÃO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (HOCHBERG, 1997). ....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO 2 – PARECER DO CEP .....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - ASSENTIMENTO.....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO 4 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO 5 - ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO 2000 (SLEDAI-2K) (HOCHBERG, 1997). ....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO 6 - SISTEMA DE PONTUAÇÃO PARA O ÍNDICE BILAG - VERSÃO 3 (ADAPTADO DE HAY <i>ET AL.</i>, 1993) .....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO 7 - SYSTEMIC LUPUS INTERNATIONAL COLLABORATING CLINICS/ACR-DAMAGE INDEX (SLICC/ACR-DI) (GLADMAN <i>ET AL.</i>, 1996).....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO 8 – IMAGEM REPRESENTATIVA DO SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>SPATA5L1</i> .....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO 9 – PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS PARCIAIS DA TESE DE DOUTORADO NOS ANAIS DO CONGRESSO EUROPEU DE REUMATOLOGIA PEDIÁTRICA - 2022 .....</b>	<b>87</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica, caracterizada pelo envolvimento de múltiplos órgãos e sistemas, devido a perda da tolerância imunológica em pacientes predispostos geneticamente, e induzida por fatores ambientais e hormonais (COSTA-REIS; SULLIVAN, 2017; GHODKE-PURANIK; NIEWOLD, 2015).

Os principais mecanismos que contribuem para a perda de tolerância são defeitos na eliminação de detritos apoptóticos e apresentação de autoantígenos anormais. A resposta inflamatória no LES é amplificada pela ativação excessiva de células dendríticas plasmocitárias e produção de interferon, culminando com danos em órgãos alvos mediados por depósito de imunocomplexos e ativação anormal de linfócitos T e outras células imunológicas. Há a produção de autoanticorpos contra antígenos localizados em todas as células do corpo, principalmente anticorpos antinucleares (ANA) e anti-DNA de dupla-hélice/nativo (DNAn) (LI *et al.*, 2022; LO; TSOKOS, 2018).

O LES afeta principalmente mulheres jovens, entre 30 e 40 anos de idade, pessoas de pele negra e de etnia africana e asiática. A estimativa de prevalência e incidência no LES varia consideravelmente conforme a região estudada devido a diversos fatores, como etnia, exposição ambiental e o tipo de estudo realizado (DÖRNER; FURIE, 2019; FORTUNA; BRENNAN, 2013).

Recentemente, Baber *et al.* (2021), revisaram estudos epidemiológicos dos últimos 5 anos, e mostraram que a prevalência de LES varia de 0 a 50 casos/100.000 habitantes em países da Europa, como Itália e França, a até mais de 5000 casos/100.000 habitantes em alguns países da África, como Senegal e Uganda, enquanto que a incidência varia de 0 a 5 casos/100.000 habitantes na Itália e França, a 10 a 15 casos/100.000 habitantes na Austrália (BARBER *et al.*, 2021). Em relação à população brasileira, poucos são os estudos epidemiológicos. Em estudo realizado por Vilar e Sato (2002) na cidade de Natal/RN, a incidência de casos de LES foi de 8,7/100.000 habitantes ao ano (VILAR; SATO, 2002).

O diagnóstico do LES pode ser estabelecido por três critérios classificatórios. O mais utilizado é o critério do Colégio Americano de Reumatologia (ACR – *American College of Rheumatology*) modificado em 1997, no qual o paciente deve apresentar pelo menos quatro de onze critérios propostos, sendo estes critérios alterações clínicas ou laboratoriais (HOCHBERG, 1997). Em 2012, foram propostos novos critérios pelo Grupo Internacional de

Clínicas de Colaboração do Lúpus Sistêmico (SLICC - *Systemic Lupus International Collaboration Clinics*), que incluem algumas manifestações não contempladas pelo critério de 1997 e considera para o diagnóstico de LES a presença de nefrite lúpica isolada, confirmada por biópsia renal associada ao ANA ou anti-DNA positivo (PETRI *et al.*, 2012). Posteriormente, em 2019, foi aprovado um novo critério pela Liga Europeia contra o Reumatismo em associação com o ACR (EULAR/ACR - *European League against Rheumatism/ American College of Rheumatology*), o qual exige a presença do ANA positivo como critério de entrada e categoriza critérios em sete domínios clínicos e oito domínios imunológicos. É considerado o diagnóstico de LES nos casos que atingem uma pontuação maior ou igual a dez (Tabela 1) (ARINGER *et al.*, 2019).

Existem vários instrumentos disponíveis para a avaliação de atividade de doença no LES, sendo que os mais utilizados são o *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000* (SLEDAI – 2K) e o *British Isles Lupus Assessment Group* (BILAG), os quais foram desenvolvidos com a finalidade de padronizar a avaliação da atividade de doença por meio de critérios clínicos e laboratoriais (ARORA; ISENBERG; CASTREJON, 2020; THANOU *et al.*, 2021).

A avaliação de atividade do LES também pode ser feita pela dosagem de alguns biomarcadores plasmáticos, séricos ou urinários, como velocidade de hemossedimentação (VHS), complemento C3 e C4, anticorpos anti-DNA, taxa de filtração glomerular, sedimento urinário e grau de proteinúria (CODY; BRUNNER, 2022; KOUTSONIKOLI *et al.*, 2017).

A descoberta de novos biomarcadores tem sido amplamente investigada como uma forma de melhor entender a fisiopatologia dessa doença, assim como de ajudar no diagnóstico precoce, monitorização de atividade de doença e de resposta terapêutica. Biomarcadores genéticos, como os genes de assinatura do interferon, e séricos, como proteína S100, produtos da divisão do complemento e armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET - *neutrophil extracellular traps*) são considerados promissores (CODY; BRUNNER, 2022; ZUCCHI *et al.*, 2022)

**Tabela 1:** Critérios classificatórios utilizados para o diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico

ACR 1997	SLICC 2012	EULAR/ACR 2019	
<b>Manifestações Clínicas</b>			
			Score
1. Eritema malar	1. Lúpus cutâneo agudo	<b>Domínio constitucional</b> 1. Febre	2
2. Lesão discoide	2. Lúpus cutâneo crônico	<b>Domínio hematológico</b> 2. Leucopenia	3
3. Fotossensibilidade	3. Úlceras mucosa	3. Trombocitopenia	4
4. Úlceras orais ou nasofaríngeas	4. Alopecia não cicatricial	4. Hemólise autoimune	4
5. Artrite	5. Artrite/artralgia	<b>Domínio neuropsiquiátrico</b> 5. Delirium	2
6. Serosite	6. Serosite	6. Psicose	3
7. Nefrite: proteinúria 24 hs > 500mg ou relação proteína/creatinina na amostra urinária > 0,5, cilindrúria	7. Nefrite: proteinúria 24 hs > 500mg ou relação proteína/creatinina na amostra urinária > 0,5, cilindros eritrocitários	7. Crise epiléptica	5
8. Neurológica (convulsão, psicose)	8. Neurológica (convulsão, psicose, mononeurite, mielite, neuropatia periférica, estado confusional agudo)	<b>Domínio mucocutâneo</b> 8. Alopecia não cicatricial	2
9. Alterações hematológicas Leucopenia (<4.000/mm <sup>3</sup> ) ou linfopenia (<1.500/mm <sup>3</sup> ) ou Plaquetopenia (<100.000/mm <sup>3</sup> )	9. Anemia hemolítica	9. Úlceras orais	2
	10. Leucopenia (<4.000/mm <sup>3</sup> ) ou linfopenia (<1.000/mm <sup>3</sup> )	10. Lúpus cutâneo subagudo ou discoide	4
	11. Plaquetopenia (<100.000/mm <sup>3</sup> )	11. Lúpus cutâneo agudo	6
		<b>Domínio serosites</b> 12. Derrame pleural ou pericárdico	5
		13. Pericardite aguda	6
		<b>Domínio musculoesquelético</b> 14. Envolvimento articular	6
		<b>Domínio renal</b> 15. Proteinúria >0.5 g/24hs	4
		16. Nefrite lúpica II e V	8
		17. Nefrite lúpica III e IV	10
<b>Critérios imunológicos</b>			
1. ANA positivo	1. ANA Hep2 positivo	1. Anticorpo Antifosfolípideo positivo	2
2. Outros anticorpos	2. Anti-dsDNA positivo	2. C3 ou C4 baixo	3
	3. Anti-Sm positivo	3. C3 e C4 baixo	4
	4. Anticoagulante lúpico positivo	4. Anticorpos específicos para LES – Anti-dsDNA ou anti-Sm	6
	5. Complemento consumido		
	6. Coombs positivo (na ausência de anemia hemolítica)		

Continua

Tabela 1: Critérios classificatórios utilizados para o diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico (continuação).

ACR 1997	SLICC 2012	EULAR/ACR 2019
<b>Classificado com lúpus eritematoso sistêmico quando:</b>		
Preencher quatro ou mais critérios	Preencher quatro ou mais critérios, incluindo um clínico e um imunológico, ou ter NL em biópsia renal com presença de ANA ou anti-DNA nativo positivos.	ANA $\geq$ 1:80 nas células HEp2.  Escore $\geq$ 10 – dentro de cada domínio, apenas o critério de maior escore é contado para a pontuação total

Fonte: Autoria própria.

ACR: *American College of Rheumatology*

SLICC: *Systemic Lupus International Collaboration Clinics*

EULAR/ACR: *European League against Rheumatism/ American College of Rheumatology*

ANA: Anticorpo antinúcleo

NL: Nefrite Lúpica

### 1.1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico de início na infância

Em torno de 15% a 20% de todos os casos de LES iniciam-se durante a infância. Como geralmente os fatores hormonais não estão envolvidos nessa fase, mecanismos genéticos podem representar uma contribuição maior no lúpus eritematoso sistêmico de início na infância (LESc – do inglês *childhood-onset lupus*), o qual tem início antes dos 18 anos de idade. Esse grupo de pacientes geralmente tem apresentação mais grave, com maiores taxa de morbimortalidade, quando comparado com a doença em adultos, principalmente por envolvimento de grandes órgãos alvos, como o rim e sistema nervoso central (ALPERIN; ORTIZ-FERNÁNDEZ; SAWALHA, 2018; SAKAMOTO *et al.*, 2022; TRINDADE *et al.*; 2021).

Apesar de existirem diferenças entre o padrão de gravidade e de acometimento de órgãos no LESc, quando comparado com a doença com início na fase adulta, até o momento não existem critérios diagnósticos validados para essa faixa etária. Os mesmos critérios utilizados para o diagnóstico em adultos são aplicados em crianças (GROOT *et al.*, 2017; TRINDADE *et al.*; 2021).

O acometimento renal é uma manifestação muito frequente no LES, principalmente no LESc, sendo que a prevalência da nefrite lúpica chega a ser 10 a 30% maior do que no adulto, além de se apresentar precocemente ao diagnóstico e com maior gravidade (LIVINGSTON; BONNER; POPE, 2011; WENDERFER; RUTH; BRUNNER, 2017).

Recentemente, foi publicado um estudo de coorte observacional por Sakamoto *et al* (2022), que avaliou 1528 pacientes com diagnóstico de LESc procedentes de 27 centros de reumatologia pediátrica no Brasil, de setembro de 2016 a maio de 2019. Um mil e setenta e

sete pacientes (74,3%) apresentavam nefrite lúpica, sendo que destes, 5,4% tinham doença renal crônica. Dentre os pacientes com doença renal crônica, 61% necessitaram de diálise e 11,8% tiveram que ser submetidos ao transplante renal (SAKAMOTO *et al.*, 2022).

### 1.1.2 Nefrite Lúpica

O acometimento renal é a principal causa de morbimortalidade no LES e está presente em cerca de 60% dos pacientes. Pode se manifestar através de alterações tubulares, intersticiais, vasculares e glomerulares, sendo que esta última é a que determina a grande parte dos sinais e sintomas da nefrite lúpica (NL). A presença de glomerulonefrite está associada ao maior uso de corticoide e imunossupressores e a maiores taxas de internação hospitalar (KLUMB *et al.*; 2015).

A nefrite lúpica é classificada, histologicamente, segundo as sociedades internacionais de nefrologia e patologia (ISN/RPS - *International Society of Nephrology/Renal Pathology Society*) em 6 classes (Tabela 2). Essa classificação é baseada na avaliação de glomérulos e região túbulo-intersticial, com descrições de níveis de atividade (0-24) e cronicidade (0-12). (AUSTIN *et al.*, 1984; KLUMB *et al.*, 2015).

A avaliação imunohistoquímica clássica da nefrite lúpica evidencia a deposição glomerular de IgG, IgM, Iga, C3, C4 e C1q, simultaneamente, caracterizando uma nefrite *full-house*, a qual está presente em um quarto dos pacientes (CAMERON, 1999).

### 1.1.3 Fisiopatologia do Lúpus Eritematoso Sistêmico e Nefrite Lúpica

A fisiopatologia do LES é bem complexa e ainda não totalmente elucidada. Na forma clássica, o desenvolvimento da doença, requer a presença de uma herança poligênica associada a fatores hormonais, epigenéticos, imunoregulatórios e exposição a fatores ambientais, como infecções virais, medicamentos, luz ultra violeta e poluentes aéreos. (LO, 2022; SMITH *et al.*, 2019; TRINDADE *et al.*; 2021).

**Tabela 2:** Classificação da nefrite lúpica da *International Society of Nephrology/Renal Pathology Society 2003*

Classe I NL mesangial mínima	Glomérulos normais à microscopia ótica (MO), mas com depósitos imunes à imunofluorescência (IF).  Hiper celularidade mesangial pura em qualquer grau ou expansão da matriz mesangial pela MO com depósitos imunes no mesângio. Pode haver poucos e isolados depósitos subepiteliais ou subendoteliais visíveis à IF ou à microscopia eletrônica (ME), mas não à MO.
Classe II NL mesangial proliferativa	
Classe III NL focal	Glomerulonefrite (GN) focal ativa ou inativa, segmentar ou global, endo ou extracapilar envolvendo < 50% de todos os glomérulos, tipicamente com depósitos imunes subendoteliais com ou sem alterações mesangiais. É ainda classificada em: A, ativa; A/C, ativa/crônica; C, crônica inativa
Classe IV NL difusa	GN difusa ativa ou inativa, segmentar ou global, endo ou extra capilar envolvendo $\geq$ 50% de todos os glomérulos, tipicamente com depósitos imunes subendoteliais com ou sem alterações mesangiais. É dividida em difusa segmentar (IV-S) na qual $\geq$ 50% dos glomérulos envolvidos apresentam lesões segmentares (que envolvem menos da metade do tufo) e difusa global (IV-G) na qual $\geq$ 50% dos glomérulos envolvidos apresentam lesões globais (que envolve mais que a metade do tufo). Essa classe inclui casos com depósitos difusos em alça de arame com pouca ou nenhuma proliferação glomerular. É ainda classificada em: A, ativa; A/C, ativa/crônica; C, crônica inativa
Classe V NL membranosa	Depósitos imunes subepiteliais globais ou segmentares ou suas sequelas morfológicas à MO e IF ou ME, com ou sem alterações mesangiais. Pode ocorrer em combinação com as classes III ou IV.
Classe VI Esclerose avançada	Esclerose glomerular global em $\geq$ 90% sem atividade residual.

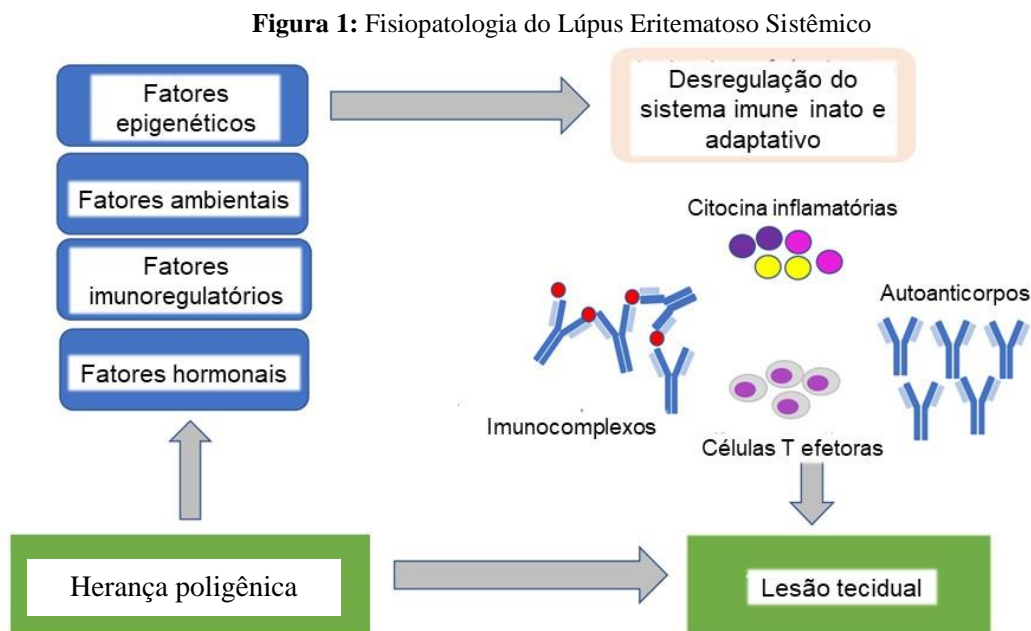
Fonte: Adaptado de Klumb *et al.* (2015).

AC, anticorpo; GN, glomerulonefrite; IF, imunofluorescência; ME, microscopia eletrônica; MO, microscopia ótica; NL, nefrite lúpica.

Há a ativação inapropriada tanto do sistema imune inato, com a participação principalmente do interferon tipo I, células dendríticas, monócitos, macrófagos e NETs, como do sistema imune adaptativo, com a desregulação dos linfócitos T e B. Isto acarreta na produção de autoanticorpos, liberação de citocinas inflamatórias, formação de imunocomplexos e ativação de linfócitos efetores, resultando em inflamação e lesão de diversos órgãos e tecidos (Figura 1) (LI *et al.*; 2022; SMITH *et al.*, 2019).



Ao nível renal, há a ativação de receptores toll-like, infiltração de leucócitos e deposição de imunocomplexos na membrana basal glomerular, que é um dos principais mecanismos fisiopatológicos. Os imunocomplexos podem ser oriundos da própria circulação sanguínea ou da produção *in situ*, no caso de formação de autoanticorpos contra antígenos glomerulares intrínsecos ou contra antígenos que surgem durante apoptose e/ou durante a eliminação incompleta de detritos apoptóticos (JAMALY *et al.*, 2021; KANT *et al.*; 2022; PARIKH *et al.*; 2020).



Fonte: Adaptado de Smith *et al.* (2019).

#### 1.1.4 Fatores genéticos

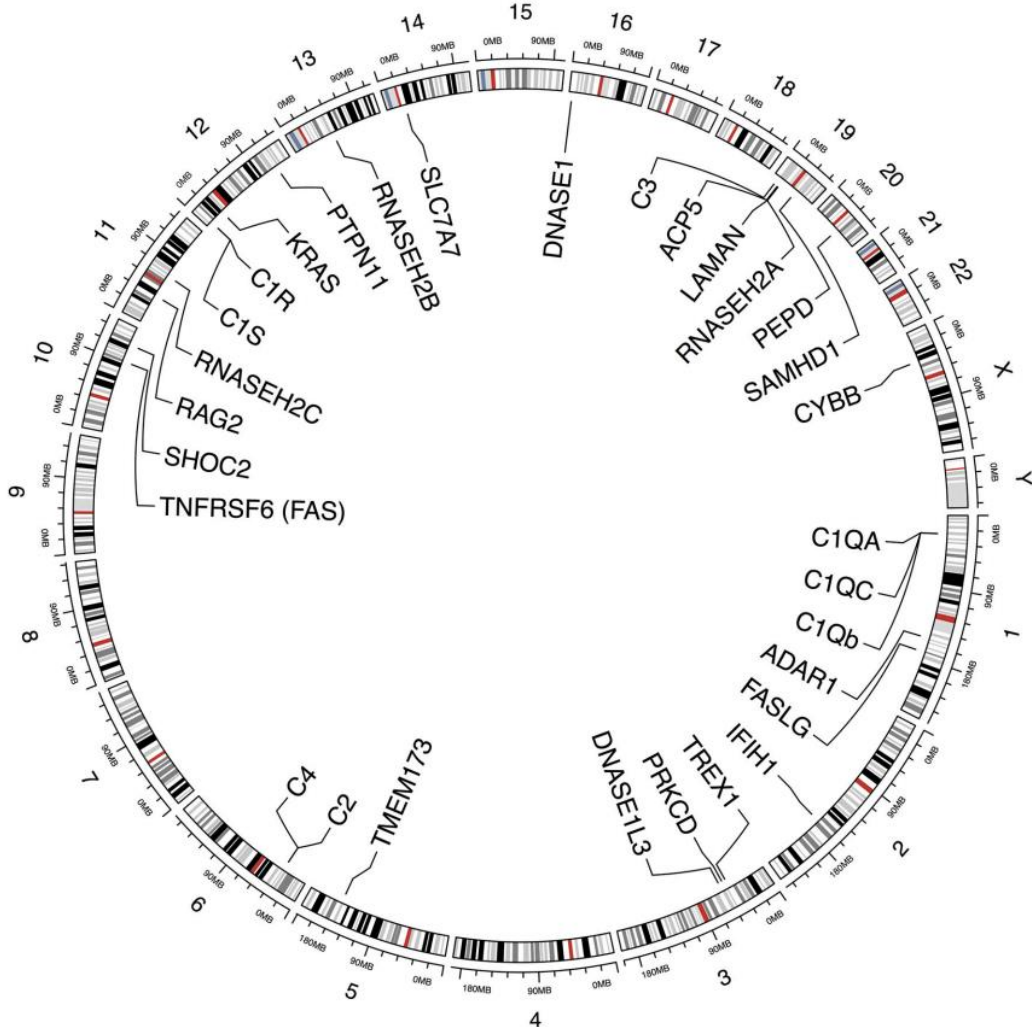
Atualmente, a associação genética no LES é bem descrita. Famílias com vários membros afetados seguem uma herança poligênica com múltiplos alelos que se combinam resultando em um risco genético geral, não seguindo o padrão de herança mendeliano clássico. Estudos de associação ampla do genoma (do inglês, *genome-wide association studies* (GWAS)) e estudos genéticos de caso-controle observaram mais de 80 *loci* de risco comum associados à suscetibilidade no LES (Figura 2) (CHEN; MORRIS; VYSE, 2017; COSTA-REIS; SULLIVAN, 2017; GHODKE-PURANIK; NIEWOLD, 2015; KWON *et al.*; 2019).



Muitos genes relacionados à suscetibilidade no LES estão sendo estudados para avaliar sua contribuição na nefrite lúpica. Modificações em alelos *HLA* estão associados com esta manifestação e alguns genes identificados como de risco para nefrite lúpica, como *APOL1*, *PDGFRA* e *HAS2*, não foram encontrados em pacientes lúpicos sem nefrite (ANDERS *et al.*, 2020; PARIKH *et al.*; 2020).

Em estudo realizado em nosso serviço, avaliamos o sequenciamento do exoma completo de uma paciente, que apresentou aos seis meses de idade nefrite lúpica grave com pouca resposta ao tratamento convencional. Foi encontrada uma variante *missense* no gene *SPATA5L1* em homozigose no cromossomo 15 (C>G) (rs 143453038). Essa variante de baixa-frequência (frequência alélica 0,027, ABraOM database), presente no éxon 1, promove a substituição de uma serina por uma cisteína na posição 273 (Ser273Cys) do peptídeo resultante. Através de sequenciamento por Sanger, confirmamos a mutação na paciente e encontramos em ambos os pais um alelo mutante, sendo assim portadores da variante (heterizogotos). A análise da dinâmica molecular da proteína evidenciou que o mutante S273C do *SPATA5L1* pode afetar a estabilidade e compactação da proteína. Ensaio de imuno-histoquímica mostraram intensa imunomarcagem da proteína SPATA5L1 no citoplasma de linfócitos e plasmócitos, infiltrando o estômago e o cólon e nas células epiteliais basais do estômago e criptas colônicas. Também foi encontrada intensa imunomarcagem da proteína na medula óssea e em tecido renal (glomérulos e túbulos) em relação a controles normais (DE CARVALHO *et al.*; 2022).

**Figura 3:** Representação esquemática descrevendo genes e localizações cromossômicas previamente identificadas como implicadas no LES monogênico.



Fonte: Alperin *et al.* (2018)

## 1.2 GENÉTICA X RIM

Alguns estudos associam polimorfismos de base única (SNPs) com doença renal crônica. Köttgen *et al* (2009) realizaram um estudo de associação ampla do genoma (GWAS) com o objetivo de identificar *loci* de susceptibilidade genética em uma população de ancestralidade europeia e encontraram uma significativa associação ( $p < 5 \times 10^{-8}$ ) para SNPs e doença renal crônica (DRC) nos seguintes *loci* gênicos: *UMOD*, *SHROOM3*, *GATM/SPATA5L1*, *CST* e *STC1*, dando pela primeira vez um novo *insight* na patogênese dessas doenças, mostrando a importância de variantes genéticas comuns que podem influenciar na função e doenças renais.

Ainda neste estudo, foi observado que o SNP rs2467853 no gene *SPATA5L1*, que está localizado no locus *GATM/SPATA5L1*, foi significativamente associado com a taxa de filtração glomerular ( $p=6 \times 10^{-14}$ ). Rs2467853 é um SNP intrônico, sem significância biológica conhecida até o momento. *GATM* codifica uma glicina aminotransferase, enzima envolvida na biossíntese da creatinina. SNPs neste locus poderiam estar relacionados aos níveis séricos de creatinina sem necessariamente estarem associados a doenças renais. (KOTTGEN *et al.*, 2009).

Diante destes resultados, em 2010, foi realizado o “The CKDGen consortium” onde foram avaliados 67.093 indivíduos caucasianos de 20 populações através de uma meta-análise de estudos de associação de genoma completo, com a finalidade de identificar, de forma mais abrangente, novos loci de susceptibilidade à função renal. Treze novos loci foram identificados associados à função e doença renal crônica: *LASS2*, *GCKR*, *ALMS1*, *TFDP2*, *DAB2*, *SLC34A1*, *VEGFA*, *PRKAG2*, *PIP5K1B*, *ATXN2*, *DACHI*, *UBE2Q2* e *SLC7A9*. Outros, como *GATM/SPATA5L1* foram novamente associados, desta vez relacionado ao SNP intergênico rs2453533 (KOTTGEN *et al.*, 2010).

Park *et al.* (2013), utilizando conhecimentos prévios de estudos realizados anteriormente por Köttgen *et al.* (2009;2010), avaliaram genes candidatos para função e doença renal em 1007 indivíduos de 73 famílias de origem mongólica. Uma análise de ligação, identificou dois *loci* candidatos próximos às regiões 9q21 e 15q15. Uma análise subsequente de associação, realizada dentro das famílias, mostrou significância para 2 e 10 SNPs em cada uma dessas regiões, respectivamente. Dois SNPs rs17400257 (cromossomo 9) e rs1153831 (cromossomo 15) apresentaram p-valor altamente significativo:  $7.21 \times 10^{-9}$  e  $2.47 \times 10^{-11}$ , respectivamente. É válido considerar que os genes *FRMD3*, *GATM* e *SPATA5L1*, localizados perto desses SNPs, já haviam sido considerados genes candidatos para o controle da função renal. Dois outros SNPs rs1153829 e rs8042811, estavam em forte desequilíbrio de ligação com rs1153831. Assim sendo, os autores desse estudo consideraram ter identificado possíveis *loci* determinantes da função renal (PARK *et al.*, 2013).

Recentemente, um estudo envolvendo uma coorte de homens japoneses investigou a associação de 59 SNPs candidatos, sendo 17 relacionados às doenças renais crônicas e 42 doenças ateroscleróticas. Quatrocentos e trinta e dois participantes da pesquisa foram genotipados para os SNPs candidatos às doenças renais, sendo que 8 SNPs foram considerados estatisticamente significantes rs3732379 (*CX3CR1*), rs17319721 (*SHROOM3*), rs1800591 (*MTP*), rs4744712 (*PIP5K1B*), rs662799 (*APOA5*), rs3782886 (*BRAP*), rs2467853

(*SPATA5L1*) e rs1024611 (*MCPI*). Dentre estes resultados, rs3782886 (*BRAP*) e rs2467853 (*SPATA5L1*) foram ainda estatisticamente associados aos níveis de creatinina ( $p < 0.0001$ ), demonstrando, mais uma vez, a associação de SNPs na região do gene *SPATA5L1* e sua possível relação com a patogênese das doenças renais crônicas (KUBO *et al.*, 2017).

### 1.3 *SPATA5L1*

O gene *SPATA5L1* (*Spermatogenesis Associated 5 Like 1*) está localizado no cromossomo 15: fita direita 45,402,336-45,421,415. Ele contém 8 exons e codifica uma proteína de 753 aminoácidos. Ele está expresso em diferentes tecidos, entre eles no rim<sup>1</sup>. Existem 5717 variantes alélicas desse gene. A proteína codificada por este gene, interage diretamente com proteínas que desempenham um papel central na regulação proteossômica, controle e progressão do ciclo celular, além de mecanismos de apoptose (Figura 4).

O complexo proteassoma é formado por proteases responsáveis pela degradação de proteínas endógenas danificadas ou desnecessárias, influenciando na regulação de numerosos processos celulares como ciclo celular, transcrição, sinalização e controle de qualidade da proteína. É também responsável pela entrega de peptídeos imunocompetentes ao maquinário de apresentação de antígenos, que é um processo fundamental para a manutenção da tolerância periférica (CHEN; VON MIKECZ, 2005) (ROUSSEAU; BERTOLOTTI, 2018; THIBAudeau; SMITH, 2019).

Recentemente, variantes bi-alélicas do gene *SPATA5L1* foram associadas à perda auditiva neurosensorial (RICHARD; BAKHTIARI; MARSH; KAIYRZHANOV *et al.*, 2021) e foi evidenciado que as proteínas codificadas pelos genes *SPATA5L1*, *C1ORF109*, *CINP* e *SPATA5* são essenciais para a biogênese e maturação ribossomal (NI; SCHMITZ; LEE; PAWŁOWSKI *et al.*, 2022). Um estudo isolado mostrou que variantes do *SPATA5L1* estão ligadas ao autismo (MATSUNAMI; HENSEL; BAIRD; STEVENS *et al.*, 2014).

Atualmente, há uma proposta de mudança da nomenclatura do gene pelo *Human Genome Organisation Gene Nomenclature Committee* (HGNC), de *SPATA5L1*, para *AFG2B* de acordo com seu ortólogo de levedura e seguindo solicitações de pesquisadores da área (informação pessoal)<sup>2</sup>.

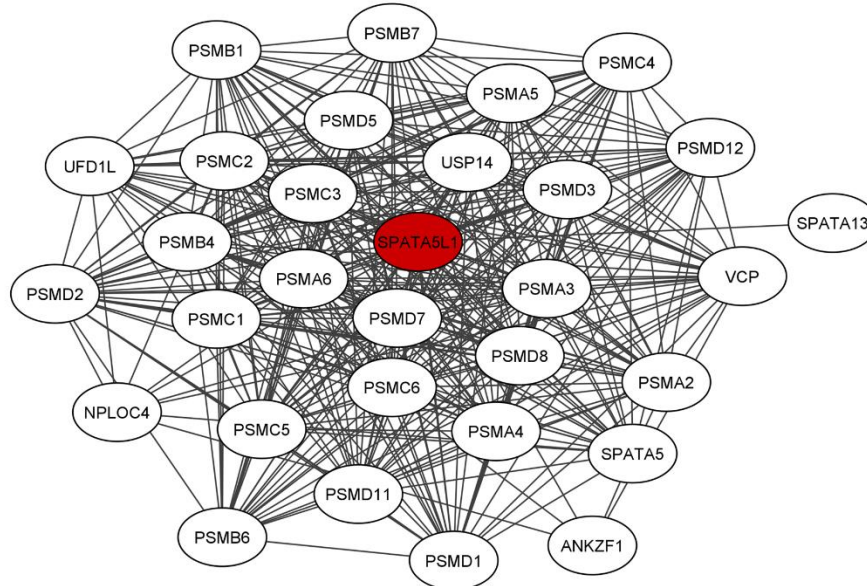
<sup>1</sup> GeneCards. Disponível em: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SPATA5L1>. Acesso em: 20 dez. 2022.

<sup>2</sup> Braschi, B. Nomenclature update of C1orf109, SPATA5 and SPATA5L1. Destinatário: Luciana Martins de Carvalho (Ribeirão Preto), 9 de set de 2022. Mensagem eletrônica.



**Figura 4:** Rede de interações proteína-proteína estabelecida pela proteína do gene SPATA5L1 e enriquecimento das proteínas da rede de interações proteína-proteína com SPATA5L1

**A**



**B**

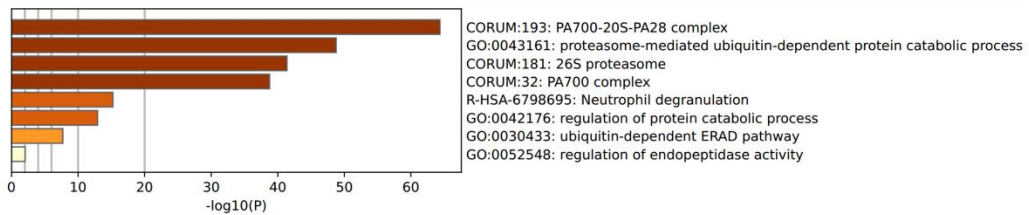


Figura 4: (A) Rede de interações proteína-proteína (PPI, do inglês) estabelecida pela proteína do gene SPATA5L1 no STRING (VON MERING; HUYNEN; JAEGLI; SCHMIDT *et al.*, 2003). Os “nós” e interações foram visualizados no Cytoscape (SHANNON; MARKIEL; OZIER; BALIGA *et al.*, 2003). Fonte (A): autoria própria (B) Enriquecimento das proteínas do PPI com SPATA5L1 mostram uma associação com complexo enzimático multisubunidades que desempenha um papel central de mecanismos proteossômicos, Fonte (B): Acessada no Metascape (ZHOU; ZHOU; PACHE; CHANG *et al.*, 2019).

Assim sendo, entre possíveis associações genéticas no LES, surgiu o interesse em relação ao estudo de variantes relacionados ao proteossoma.

Visto que foi observado, em estudo prévio de nossa autoria, alta expressão da proteína SPATA5L1 no rim de uma paciente de 6 meses, com diagnóstico de nefrite lúpica *full-house*, associado a uma variante missense no gene SPATA5L1, surgiu o interesse de ampliar esse estudo em pacientes com diagnóstico de LES com e sem nefrite lúpica.

## 2 JUSTIFICATIVA

Até o momento, não existe nenhum estudo na literatura que avalie a associação entre variantes no gene *SPATA5L1* com doença renal em pacientes com LES.

Sendo o *SPATA5L1* um gene promissor na regulação de mecanismos de tolerância imunológica, e sendo a quebra dessa tolerância, um dos principais fatores associados ao desencadeamento do LES, surgiu a motivação para esse estudo, com o objetivo de explorar fatores possivelmente implicados na etiopatogênese da doença, proporcionando novos caminhos para pesquisas de biomarcadores e alternativas terapêuticas.



### 3 OBJETIVOS

#### **Objetivo geral:**

Determinar a frequência de variantes no gene *SPATA5L1* no LESc e a sua expressão renal em pacientes com nefrite lúpica de início na infância.

#### **Objetivos específicos:**

- Associar possíveis variantes no gene *SPATA5L1* com gravidade do LESc e nefrite lúpica;
- Associar possíveis variantes no gene *SPATA5L1* com LESc de início muito precoce;
- Associar a expressão renal do *SPATA5L1* com a gravidade e atividade do LES;
- Associar a expressão renal do *SPATA5L1* com a classificação da nefrite lúpica;
- Comparar a expressão renal do *SPATA5L1* entre pacientes com LESc, síndrome nefrótica idiopática da infância e rins normais.

## 4 PACIENTES E MÉTODOS

### 4.1. DESENHO DO ESTUDO

Este foi um estudo transversal observacional composto de duas fases.

A primeira fase teve como objetivo determinar a frequência de variantes no gene *SPATA5L1* e incluiu a população de pacientes com diagnóstico de LESc acompanhada nos ambulatórios de Reumatologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), no período de janeiro de 2019 a fevereiro de 2020.

Na segunda fase, com o objetivo de avaliar a expressão renal da proteína *SPATA5L1* em paciente com LESc, foram avaliadas amostras de biópsias renais com nefrite lúpica, provenientes de pacientes que haviam realizado biópsia renal durante o acompanhamento médico e estavam incluídos na primeira fase do projeto. Para comparação dos resultados de expressão renal da proteína no LESc foram utilizadas amostras de biópsias renais de pacientes com diagnóstico de síndrome nefrótica idiopática da infância (SNI) e amostras de biópsias de rins normais.

### 4.2. PARTICIPANTES

Os pacientes com LESc em acompanhamento nos ambulatórios de Reumatologia Pediátrica, no período de janeiro de 2019 a fevereiro de 2020, foram convidados a participar. Todos os 45 pacientes que faziam acompanhamento nesse período e preenchiam os critérios de inclusão participaram do estudo.

O diagnóstico de LES foi realizado de acordo com os critérios de classificação do *American College of Rheumatology* (ACR) (ANEXO 1) (HOCHBERG, 1997). LESc foi definido como o LES de início antes dos 18 anos de idade (SILVA; AVCIN; BRUNNER, 2012).

As biópsias de pacientes com SNI e rins normais foram disponibilizadas pelo Serviço de Patologia e Medicina Legal do HCFMRP-USP. Oito biópsias oriundas de pacientes em acompanhamento com diagnóstico de SNI foram incluídas no estudo, bem como 4 biópsias de amostras de rins normais oriundas de pacientes nefrectomizados pós acidente.

Síndrome Nefrótica Idiopática da infância foi definida como a presença de proteinúria maciça (relação proteína/creatinina em amostra de urina isolada > 2mg/ml) e

hipoalbuminemia (albumina sérica < 2,5g/ml) (KDIGO, 2021).

#### 4.4 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Normas Éticas Regulamentadoras em Pesquisa do HCFMRP-USP, com número do parecer 3.458.351 (ANEXO 2). Todos os pacientes convidados a participar do estudo leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, adaptado para crianças e adolescentes (ANEXO 3). Os responsáveis pelos pacientes também leram e assinaram o termo de assentimento livre e esclarecido (ANEXO 4).

#### 4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Para os pacientes com LESC:

- Pacientes com LES pelos critérios de classificação diagnóstica do *American College of Rheumatology* (ACR);
- Início da doença antes de completar 18 anos de idade – LESC;
- Acompanhamento nos ambulatórios de Reumatologia Pediátrica do HCFMRP-USP;
- Concordância em participar do estudo após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) ou de assentimento pelos pais quando indicado.

Para os pacientes com síndrome SNI (controle 1):

- Ter síndrome nefrótica;
- Ter sido excluídas causas secundárias de síndrome nefrótica;
- Acompanhamento nos ambulatórios de Nefrologia Pediátrica do HCFMRP-USP;
- Ter biópsia renal armazenada no Serviço de Patologia e Medicina Legal do HCFMRP-USP;
- Concordância em participar do estudo após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) ou de assentimento pelos pais quando indicado.

Foram incluídas no estudo, para análise como controle normal (controle 2), biópsias renais, disponibilizadas pelo Serviço de Patologia e Medicina Legal do HCFMRP-USP, oriundas de nefrectomias de pacientes saudáveis, pós acidentes.

#### 4.6 AVALIAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS

Os prontuários de todos os pacientes com LESC e SNI do estudo foram analisados retrospectivamente para caracterização demográfica, clínica e histológica das biópsias renais. O sequenciamento do gene *SPATA5LI* foi realizado em todos os pacientes com diagnóstico de LESC do estudo

Para os pacientes com biópsias renais, as informações clinico-laboratoriais, registradas em prontuários, foram colhidas com intervalo máximo de 10 dias à realização da biópsia, para avaliação dos seguintes itens:

- SLEDAI-2K (Índice de atividade do LES – ANEXO 5). A escala do índice varia de 0 a 105. Foram considerados os índices absolutos para análises estatísticas (GLADMAN; IBAÑEZ; UROWITZ, 2002).
- BILAG (Índice de atividade de doença do grupo de avaliação de LES das Ilhas Britânicas – ANEXO 6). Foi considerado o índice qualitativo para o BILAG renal que apresenta 5 categorias decrescentes de atividade, que vão desde doença muito ativa, até sistema nunca acometido. Utilizamos as categorias A (doença ativa que exige uso de droga modificadora de doença, imunossupressor ou prednisolona > 20mg/d), B (doença menos ativa que em “A”; problemas reversíveis que exigem apenas terapia sintomática, como antimaláricos, antiinflamatório não hormonal ou prednisolona < 20mg/d) e C (doença leve estável) (HAY *et al.*, 1993).
- SLICC/ACR (*Lupus International Collaboration Clinics/ American College of Rheumatology* – ANEXO 7). Índice que avalia sequelas relacionadas à doença, sendo 19 variáveis, divididas em 10 sistemas, classificadas como presentes ou ausentes, determinando o dano cumulativo. Foi considerada a presença ou não de danos (GLADMAN *et al.*, 1996).

A caracterização laboratorial foi realizada por análise retrospectiva dos exames de rotina dos pacientes, necessários para o preenchimento dos índices acima (titulação de anti-DNA nativo, dosagem de complemento C3 e C4, urina rotina e hemograma).

A atividade inflamatória dos pacientes, no momento de realização da biópsia renal, foi avaliada através das provas de atividade inflamatórias PCR (proteína C reativa) e VHS (velocidade de hemossedimentação).

A atividade da nefrite lúpica foi avaliada pela proteinúria, pela taxa de filtração glomerular estimada (TFGe) e pelo índice de atividade da biópsia.

A proteinúria foi quantificada pela relação entre a proteína e a creatinina urinária em uma amostra isolada. Foi considerada sem proteinúria se relação em mg/g < 200, leve de 200 – 1000, moderada entre 1000 e 2000 e maciça se > 2000. Proteinúria nefrótica foi considerada se valores  $\geq$  2000 mg/ml e proteinúria não nefrótica para valores abaixo de 2000 mg/ml (KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases, 2021).

A TFGe foi calculada pela fórmula de Schawartz (TFGe= 0,55 x altura (cm)/creatinina). Para esse estudo consideramos a taxa de filtração normal quando  $\geq$  90 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> (LEVIN, 2013).

As classes histológicas das biópsias renais foram definidas segundo as sociedades internacionais de nefrologia e patologia (ISN/RPS) em classes I, II, III, IV, V e VI (KLUMB; SILVA; LANNA; SATO *et al.*, 2015), sendo considerado baixo índice de atividade valores menores que 12 e alto índice de atividade valores iguais ou maiores que 12 (AUSTIN *et al.*, 1984). Também foi observado se o paciente apresentava ou não sinais de cronicidade na biópsia renal.

#### 4.7 EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DO DNA

Foram coletados cerca de 10 ml de sangue, sendo 5 ml em tubo anticoagulante EDTA e 5 ml em tubo seco, que foi encaminhada para o Laboratório de Pediatria do HCFMRP - USP para extração do DNA, que foi utilizado para o sequenciamento dos 8 exons do gene. O DNA foi isolado com o DNazol, segundo protocolo padrão.

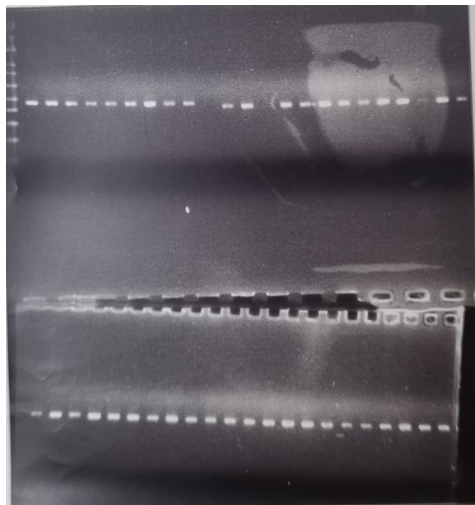
#### 4.8 SEQUENCIAMENTO DO GENE *SPATA5L1*

Após a extração do DNA foi realizada PCR utilizando os primers descritos na tabela 3 para a identificação de possíveis variantes. Para o desenhos dos primers de cada exon, foram escolhidas regiões que continham, além dos exons, 100 pares de bases localizadas antes e depois de cada exon, de modo que o produto final tivesse em torno de 300 a 500 pares de

base. Além disso, as regiões deveriam ter a menor quantidade possível (em torno de 50% ou menos) das bases nitrogenadas CG para que o produto não precisasse de uma temperatura de anelamento muito alta. A temperatura utilizada para anelamento dos primers foi baseada na temperatura sugerida pela ferramenta Tm Calculator (<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>) e ficou entre 55 e 65°C. Foi utilizada a ferramenta OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) para verificar a qualidade dos primers desenvolvidos. A amplificação dos PCRs foi realizada pela ferramenta UCSC In-Silico PCR (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>).

Após a amplificação, o produto de PCR dos diferentes exons gerados, os quais variaram de 240 a 450 pb, foram visualizados em gel de agarose 2%, para verificar a especificidade e o tamanho do fragmento (figura 5). O produto de PCR foi então tratado com Exo-SAP-IT (USB Corporation, Cleveland, OH) e submetido ao sequenciamento direto utilizando o kit BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) seguindo as instruções do fabricante. As sequências obtidas foram analisadas pelos Softwares Codon Code Aligner e as variantes encontradas foram avaliadas pelo programa Mutation Taster<sup>3</sup>.

Figura 5: Representação da visualização em gel de agarose 2% dos produtos de PCR amplificados dos exons gerados do gene *SPATA5LI*, oriundos dos pacientes com SLEc.



Fonte: Arquivo pessoal

<sup>3</sup> Disponível em: [www.mutationtaster.org](http://www.mutationtaster.org). Acesso em: 20 nov. 2022.

**Tabela 3:** Primers utilizados para o sequenciamento dos exons do gene SPATA5L1

<b>Exon</b>	<b>Gene</b>	<b>Primers</b>	<b>Tamanho do fragmento</b>
<b>1</b>	SPATA5L1 1F	GTGCTCCTGGCGGGGCC	240pb
	SPATA5L1 1R	TGCTCGACTGCCCCGCTG	
<b>2</b>	SPATA5L1 2F	TGTACCCATGAGCCAACC	444 pb
	SPATA5L1 2R	TAAGGAAAATGTACTCACCGC	
<b>3</b>	SPATA5L1 3F	GGCAGGGAGACATTTAATTCTT	416 pb
	SPATA5L1 3R	AGAGCAGTTTCAGCGCAGTATG	
<b>4</b>	SPATA5L1 4F	GGAGGCTGAGAATTGTTAAA	409 pb
	SPATA5L1 4R	TAACTGGAAAAAACACTAGTAA	
<b>5</b>	SPATA5L1 5F	GAGCAACAGAGCAAGACTGTC	514 pb
	SPATA5L1 5R	TACCTCACCTTTCCTAGCC	
<b>6</b>	SPATA5L1 6F	ACACAAAGTAGCTCTTTGGT	404 pb
	SPATA5L1 6R	CCATGGACACCTATATCCAAG	
<b>7</b>	SPATA5L1 7F	CTCGGTAATGTGAAAGGAAACT	332 pb
	SPATA5L1 7R	CATGGTACCACACAGGCTT	
<b>8</b>	SPATA5L1 8F	GCCTGGGCAATAAGAGCAA	312 pb
	SPATA5L1 8R	CGACAGGCAAGTTCACATT	

Fonte: autoria própria.

#### 4.9 EXPRESSÃO PROTEICA DO SPATA5L1 POR IMUNOHISTOQUÍMICA

Amostras de biópsias renais foram submetidas a cortes histológicos de 4µm de espessura por método colorimétrico (imuno-histoquímica) para SPATA5L1. Após completa desparafinização e posterior hidratação, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em tampão citrato de sódio (pH 6,0). Após três lavagens com tampão fosfato salina (PBS), os cortes foram tratados com solução 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Os cortes histológicos novamente foram lavados três vezes com PBS e incubados com: anti-SPATA5L1 (Abcam, Cambridge, MA; ab80885) devidamente diluído, de acordo com instruções dos fabricantes.

Decorrido o período de incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados três vezes com PBS e incubados com LINKER para Rabbit, e em seguida incubados com o polímero EnVision FLEX Mini Kit, High pH e o complexo antígeno-anticorpo formado foi detectado com o cromógeno diaminobenzidina (DAB). Por último, as lâminas foram contra corados com Hematoxilina de Harris, desidratadas e montadas com Permout (MERCK,

Darmstadt, DE). Todas as etapas após a recuperação antigênica foram realizadas em temperatura ambiente.

Biópsias de tecidos de pâncreas normal foi utilizado como controle positivo, de acordo com o recomendado pelo fabricante. Já como controle negativo da reação foi realizado por meio da substituição do anticorpo primário por tampão PBS 1X.

A imunomarcção foi analisada separadamente nos túbulos e glomérulos. Para isto, foi feita uma semiquantificação da intensidade da imunomarcção utilizando-se o software ImageJ Fiji (ImageJ versão 2.0) conforme descrito por Patera *et al.* (2019). Brevemente, foi realizado um processamento de imagens representativas para túbulos e glomérulos de cada caso por meio da conversão em três imagens digitais independentes (H&E, DAB e uma imagem complementar). A imagem DAB foi convertida para 8 bits e selecionado duas imagens/campos representativos para os túbulos e os glomérulos de interesse selecionados manualmente. Para cada imagem, foram obtidas uma intensidade média e uma intensidade máxima de cinza (255 para uma imagem de 8 bits). Os dados foram apresentados como densidade óptica (valor médio de cinza), sendo calculados pela fórmula densidade óptica =  $\log(\text{intensidade máxima/intensidade média})$  (PATERA *et al.*; 2019; SANTANA-KRÍMSKAYA *et al.*, 2020)

#### 4.10 ANÁLISE IN SÍLICO

Dois bancos de dados, publicamente disponíveis no Gene Expression Omnibus (GEO) usando o GEO2R, provenientes de amostras humanas diagnosticadas com nefrite lúpica e avaliadas por Affymetrix Human Transcriptome Array 2.0, foram acessados aonde foi possível analisar a expressão gênica do *SPATA5L1*.

O banco de dados de GSE32591 (BERTHIER *et al.*, 2012) inclui 47 biópsias renais, sendo 32 pacientes com NL e 15 pacientes que não apresentam a doença (controle normal). Já o GSE127797 (ALMAANI; PROKOPEC; ZHANG; YU *et al.*, 2019), por sua vez, contém 88 amostras de NL, incluindo 47 biópsias de túbulos e 41 glomérulos renais. Para cada banco de dados, as amostras foram divididas em dois grupos de tubulointerstício ou glomérulo por meio da microdissecação e submetidas à análise de transcriptoma.

Para os pacientes que apresentaram variantes no gene *SPATA5L1* foi realizada a modelagem da proteína SPATA5L1 e sua dinâmica molecular.

A sequência da proteína SPATA5L1 foi recuperada do banco de dados da *Uniprot Knowledge Base* (UniprotKB), através do identificador de acesso Q9BVQ7. Em seguida, a



estrutura foi modelada usando o servidor da Web I-TASSER usando parâmetros padrão. O refinamento do modelo foi feito usando o software 3Drefine. A qualidade do refinamento foi avaliada pelo escore MolProbity. Para a validação do modelo foram utilizados os softwares ERRAT, PROCHECK e PROSa com seus parâmetros predefinidos. As alterações de aminoácidos da proteína SPATA5L1 foram feitas usando a ferramenta Mutagenesis no PyMol<sup>4</sup>.

As estruturas de tipo nativas e mutantes foram investigadas por simulações de Dinâmica Molecular (DM) utilizando o programa GROMACS 2020.1 O complexo foi inserido em uma caixa cúbica de 0,7 nm, preenchendo o espaço vazio com moléculas de água SPC-E. Foram adicionados íons de cálcio e sódio para atingir o equilíbrio eletrônico do sistema. A minimização de energia foi realizada usando parâmetros padrão. A fase de equilíbrio durou 10 ns (para temperatura e pressão), enquanto a fase de produção durou 100 ns. Essas etapas também foram executadas usando parâmetros padrão. A fim de investigar a estabilidade das estruturas, calculamos o desvio quadrático médio (RMSD), a flutuação quadrática média (RMSF), o raio de giro (Rg) e a área de superfície acessível ao solvente.

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, foi feita uma análise exploratória dos dados obtidos em todos os participantes, com a caracterização da população estudada quanto aos aspectos clínicos e laboratoriais.

As variáveis quantitativas foram representadas como média, mediana e desvio padrão e as variáveis qualitativas foram representadas pelo número de casos e valores percentuais.

Foi utilizado o teste *t de Student* para avaliação da associação das variáveis contínuas: clearance de creatinina (normal e alterado), relação entre proteína e creatinina (REL P/C) na amostra urinária (nefrótica e não nefrótica) índice de atividade ( $< 12$  e  $\geq 12$ ) e índice de cronicidade da biópsia renal (sim e não) e gênero (feminino e masculino), com a expressão tubular e glomerular da proteína SPATA5L1. O teste ANOVA foi utilizado para avaliar a associação das variáveis categóricas: BILAG (A, B e C) e classe histológica da ISN/RTP (Classes I, II, III, IV e V), com a expressão tubular e glomerular da proteína SPATA5L1

---

<sup>4</sup> Disponível em: <https://pymol.org/2/>. Acesso em 20 nov. 2022.

Foi calculada a correlação de Spearman e testada sua significância entre as variáveis VHS, PCR, SLEDAI-2k, REL P/CR na amostra urinária e a expressão tubular e glomerular da proteína SPATA5L1.

Foram utilizados os softwares R 4.1.1 e SAS 9.4 para análise estatística.

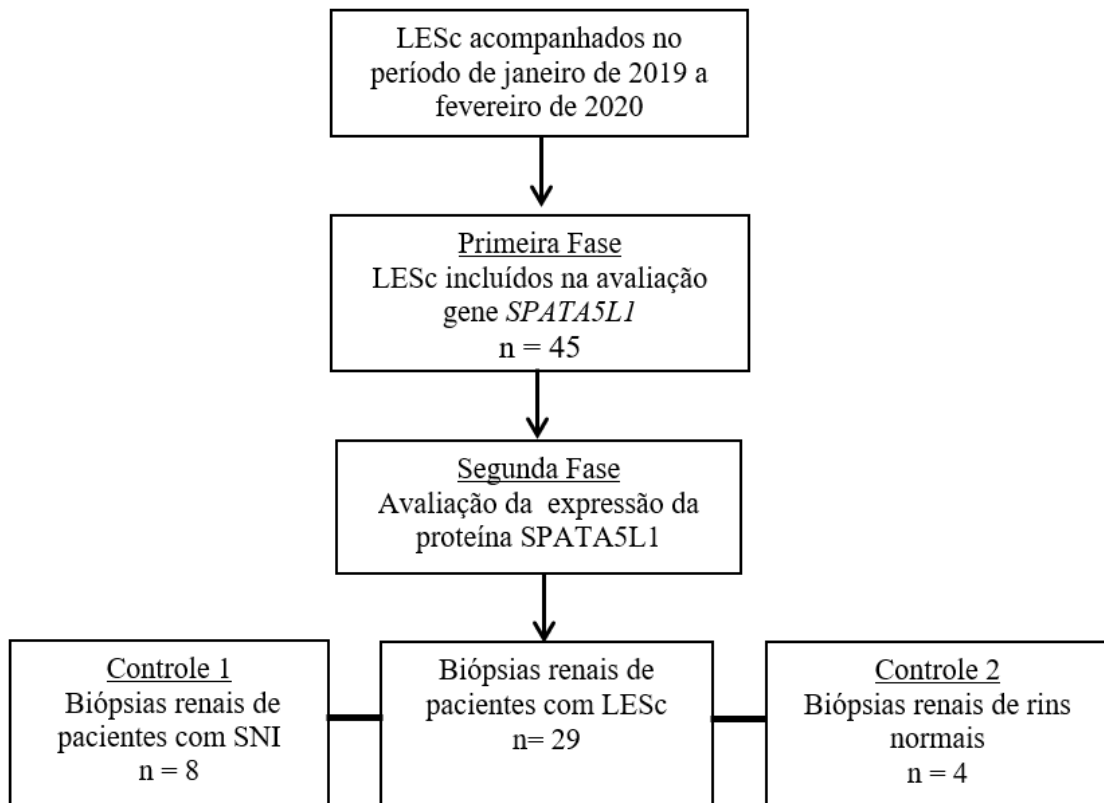
Em todos os testes estatísticos o nível de significância da variável independente foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

No período de estudo, 45 pacientes com LESc faziam acompanhamento nos ambulatórios de reumatologia pediátrica do HCFMRP-USP e todos participaram da primeira fase do estudo. Os pacientes eram na sua maioria do gênero feminino (77,7%) com mediana de idade de 11 anos (6-16 anos). Tinham realizado biópsia renal, em algum momento do seguimento, até a coleta de dados, 25 pacientes. Foram avaliadas 29 biópsias de nefrite lúpica quanto à expressão da proteína SPATA5L1 para a segunda fase do estudo. Como controles para a segunda fase, foram incluídas oito biópsias renais de seis pacientes com SNI, e quatro biópsias de rim normal (Figura 5). As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes com SNI e LESc estão descritas nas tabelas 4 e 6. A classificação das biópsias renais incluídas no estudo está descrita na tabela 5.

**Figura 6:** Organograma do desenho de estudo do projeto de pesquisa intitulado Avaliação do gene SPATA5L1 e sua expressão renal no lúpus eritematoso sistêmico



Fonte: autoria própria.

**Tabela 4:** Características demográficas, clínicas e laboratoriais, ao diagnóstico, dos 45 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância, atendidos nos ambulatórios de reumatologia pediátrica de janeiro de 2019 a fevereiro de 2020

<b>Características</b>	<b>Total (45)</b>
Gênero feminino n (%)	35 (77,7%)
Branco n (%)	29 (64,4%)
Diagnóstico antes da puberdade n (%)	19 (42,2%)
Mediana de idade (variação)	11 (6-16 anos)
Critérios diagnósticos n (%)	
Alterações renais	35 (77,7%)
Cilindros presentes	5 (11,1%)
Hematúria	15 (33,3%)
Proteinúria	13 (28,8%)
Leucocitúria	6 (13,3%)
Doença renal crônica	3 (6,6%)
Rash malar	23 (77,7%)
Lúpus discoide	3 (6,6%)
Fotosensibilidade	23 (51,1%)
Úlceras orais	9 (20%)
Alopécia não cicatricial	12 (26,6%)
Artrite	28 (62,2%)
Serosite	12 (26,6%)
Alterações neurológicas	13 (28,8%)
Alterações hematológicas	30 (66,6%)
Anemia hemolítica autoimune	24 (53,3%)
Leucopenia <4000/mm <sup>3</sup> ou linfopenia <1000/mm <sup>3</sup>	13 (28,8%)
Plaquetopenia <100.000/mm <sup>3</sup>	12 (26,6%)
Consumo de complemento (C3/C4)	36 (80%)
Anti-DNA	35 (77,7%)
Anti-Sm (n=42)	23 (54,7%)
Fator antinúcleo (ANA)	45 (100%)
Antifosfolípides	23 (51,1%)
Anticardiolipina (n=44)	19 (43,1%)
Anti beta2glicoproteína (n=39)	8 (20,5%)
Realizaram biópsia renal n(%)	29 (55,5%)

Fonte: autoria própria.

**Tabela 5:** Classificação das biópsias renais realizadas pelos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico de início na infância, atendidos nos ambulatórios de reumatologia pediátrica de janeiro de 2019 a fevereiro de 2020

Características	Total (29)
Classe I	2 (6,8%)
Classe II	4 (13,7%)
Classe III	1 (3,4%)
Classe IV	15 (51,7%)
Classe V	2 (6,8%)
Classe IV + V	3 (10,3%)
Classe VI	1 (3,4%)
Outras*	1 (3,4%)

Fonte: autoria própria.

\*Lesões cicatriciais de episódio prévio de nefrite lúpica

**Tabela 6:** Características demográficas, clínicas e laboratoriais, no momento da realização da biópsia renal, dos seis pacientes com síndrome nefrótica idiopática da infância, utilizados como grupo controle para avaliação da expressão renal da proteína SPATA5L1.

Características	Total (6)
Gênero feminino n(%)	2 (33,3)
Branco n(%)	5 (83,3)
Mediana de idade (variação)	8 (3 – 13)
Alterações renais n(%)	
Cilindros presentes	1 (16,6)
Hematúria	4 (66,6)
Proteinúria	6 (100)
Leucocitúria	3 (50)
Doença renal crônica	1 (16,6)

Fonte: autoria própria.

## 5.2 FREQUÊNCIA DE VARIANTES DO GENE SPATA5L1

Dentre os 45 pacientes avaliados, 1 (2,2%) apresentou uma variante do tipo *missense*, de troca de base única (A>G), em heterozigose, no exon 5 do gene *SPATA5L1*, já descrita na literatura (rs16943025). Essa variante causa uma alteração no aminoácido 592 da proteína, substituindo uma arginina por um ácido aspártico (N592D). Dados do site Ensembl mostram que a frequência dessa variante é de 1% na população geral, 5% em Africanos e não há

descrição em americanos, europeus e asiáticos<sup>5</sup>.

Vinte e cinco pacientes (55,5%) apresentaram o mesmo polimorfismo intrônicos (rs12440038), do tipo troca de base única (A>G), que apresenta frequência de 45% na população geral, sendo 81% em populações do leste asiático. Este polimorfismo está localizado próximo ao exon 5 (ANEXO 8), em área de *splicing* alternativo. Dentre estes pacientes, 19 (76%) eram em heterozigose. Em um participante (2,2%) foi observado a presença de um polimorfismo intrônico inédito em heterozigose, do tipo troca de base única (A>G), localizado próximo ao exon 4.

### 5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DO SPATA5L1 ORIUNDO DE BANCOS DE DADOS

Quando analisamos os bancos de dados de expressão gênica, foi observado uma maior expressão gênica de SPATA5L1 em biópsia de glomérulos de pacientes com LN em relação a rins normais glomerulares e maior expressão em amostras derivadas de glomérulos quando comparada as amostras de túbulos renais em pacientes com nefrite lúpica (Figura 6).

### 5.4 MODELAGEM E DINÂMICA MOLECULAR DA PROTEÍNA MUTANTE SPATA5L1

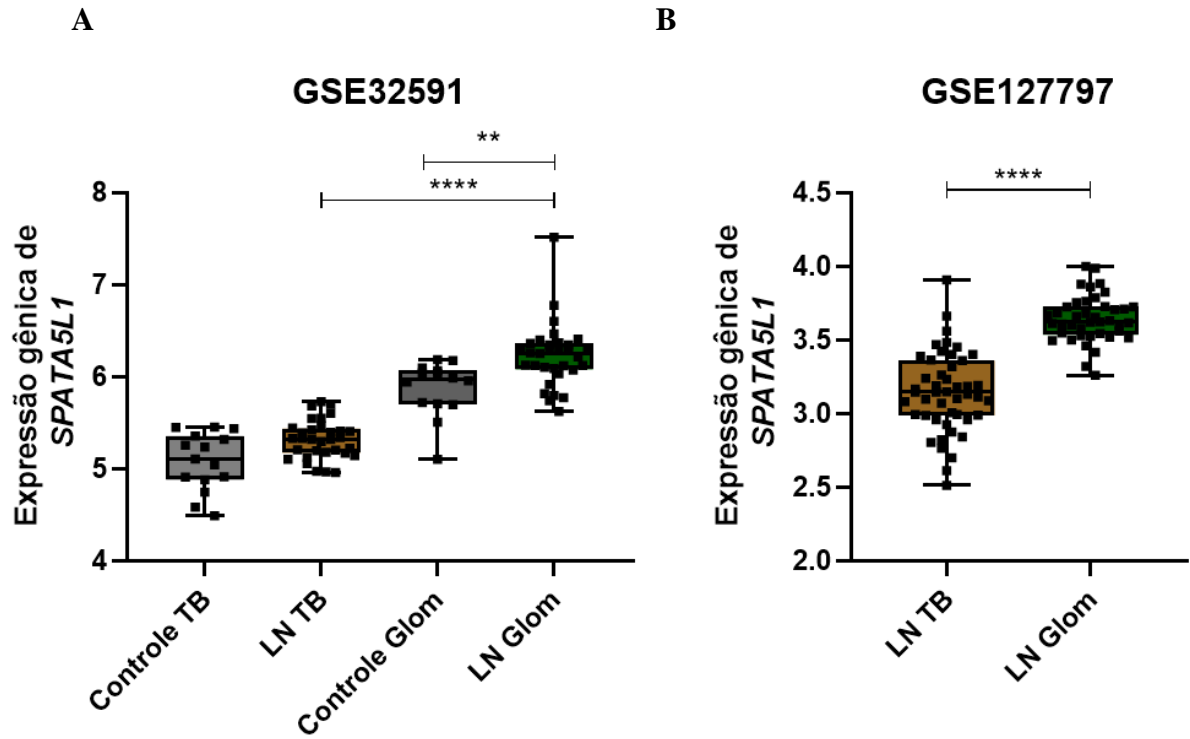
Para avaliar se a variante missense encontrada no gene *SPATA5L1* teria alguma influência sobre a estrutura da proteína transcrita, foi realizada a dinâmica molecular da proteína SPATA5L1 mutante, sendo observado que após 75ns a estrutura do tipo nativa começa a perder estabilidade, enquanto que a mutante se mantém estável até o final da simulação (Figura 7).

A modelagem da proteína SPATA5L1 está representada na figura 8.

---

<sup>5</sup>Disponível em: [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?r=15:45415216-45416216;v=rs16943025;vdb=variation;vf=106733144](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?r=15:45415216-45416216;v=rs16943025;vdb=variation;vf=106733144). Acesso em: 20 de dez. 2022.

**Figura 7:** Avaliação da expressão do gene SPATA5L1 obtida de material disponível em bancos de dados públicos



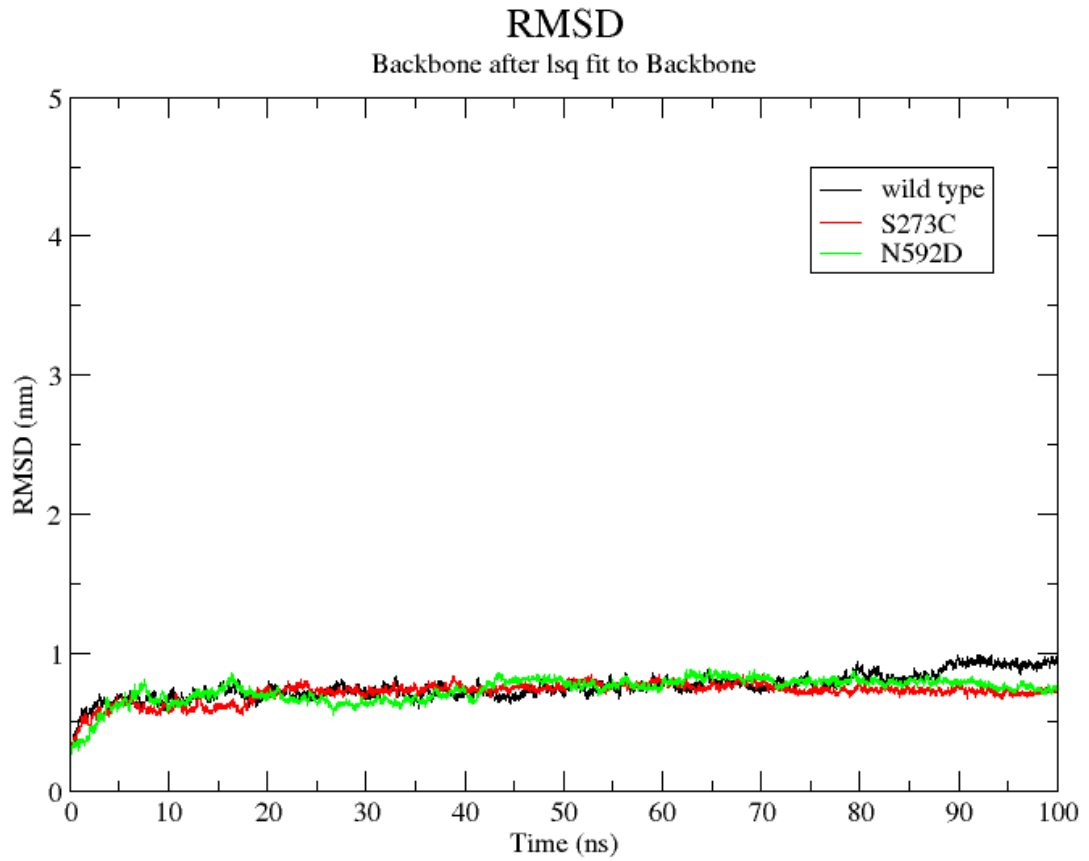
Fonte: autoria própria.

(A) Banco de dados GSE32591: Expressão gênica aumentada em túbulos e glomérulos em rins de pacientes com nefrite lúpica quando comparada com rins normais (controle). ANOVA\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$

(B) Banco de dados GSE127797: Expressão gênica aumentada em glomérulos quando comparada com túbulos renais em pacientes com nefrite lúpica. Teste Mann-Whitney \*\*\*\* $p < 0,0001$

TB: túbulo renal; LN: nefrite lúpica; Glom: glomérulo

**Figura 8:** Raiz quadrada do desvio médio (RMSD) da proteína SPATA5L1 do tipo nativo (*wild type*) e mutante (S273C e N592D) durante a simulação da dinâmica molecular



Fonte: autoria própria.

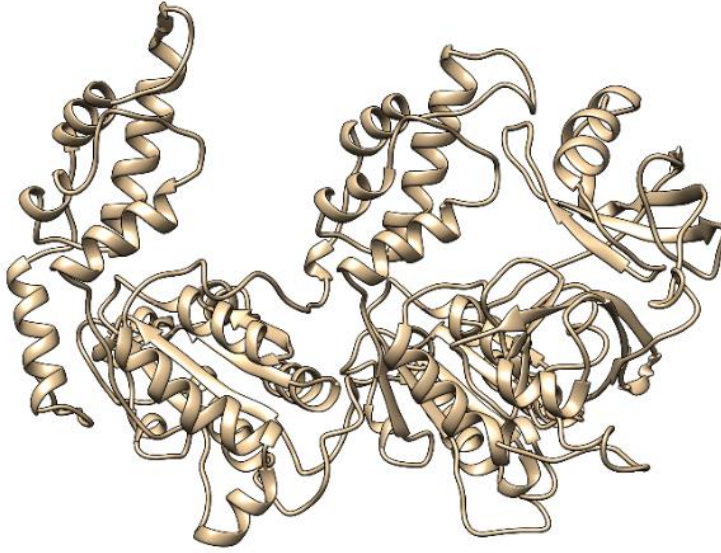
S= serina, C = cisteína no códon 273

N= arginina, D = ácido aspártico no códon 592

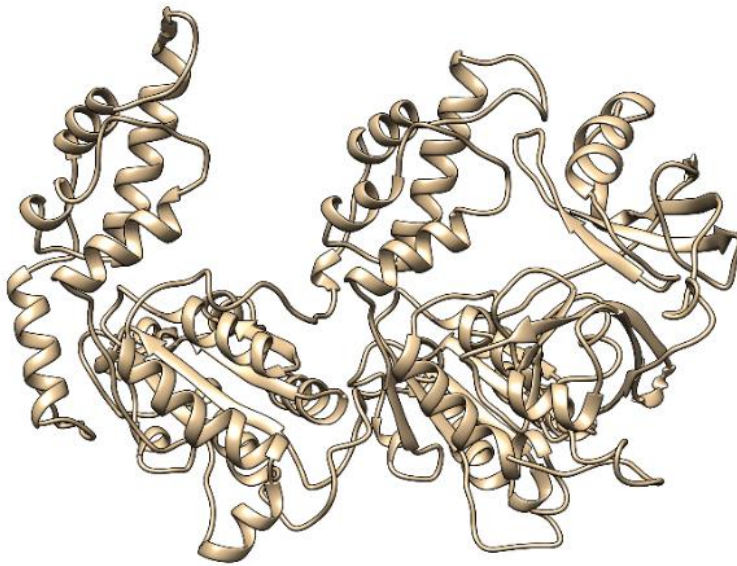


**Figura 9:** Estrutura da proteína SPATA5L1 ((A) nativa e (B) mutada) feita através de modelagem molecular

**A**



**B**



Fonte: autoria própria.

### 5.5 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DAS VARIANTES NO GENE *SPATA5L1* NOS PACIENTES COM LES COM A GRAVIDADE DO LES E DA NEFRITE LÚPICA E COM INÍCIO PRECOCE (PRÉ-PUBERAL) DA DOENÇA.

A paciente que apresentou a variante descrita era do sexo feminino, raça branca, teve o diagnóstico de LES aos nove anos de idade (diagnóstico antes da puberdade) com as seguintes manifestações: neurológicas (cefaleia), hematológicas (anemia hemolítica e trombocitopenia), renal (proteinúria moderada/grave, nefrite lúpica classe IV com índice de atividade = 5 e índice de cronicidade = 1), autoanticorpos positivos (anti-DNA, anti-Sm, anti beta2glicoproteína, ANA) e C3 e C4 consumidos. O índice de atividade de doença (SLEDAI-2K) era de 10 e o índice de dano cumulativo (SLICC) era 0.

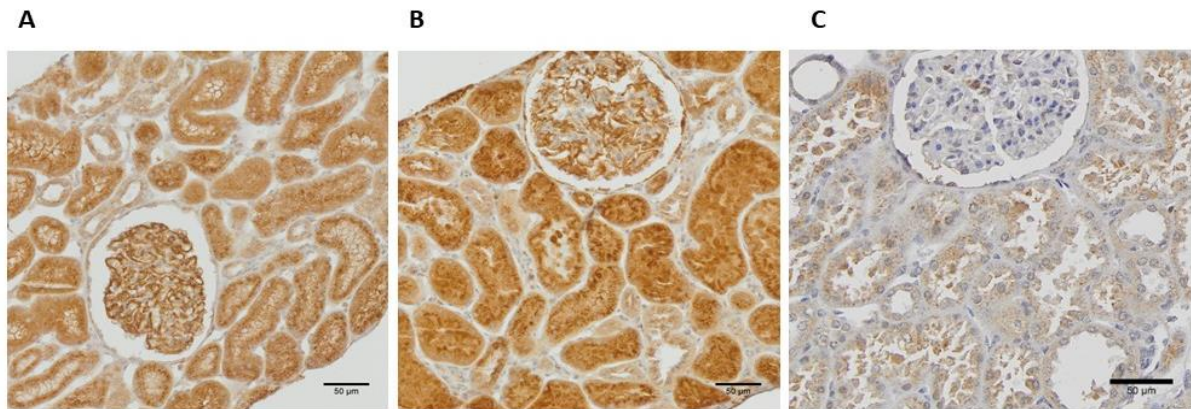
Devido a variante *missense* ter sido encontrada em apenas um paciente, não foi possível a realização de testes estatísticos para determinar possíveis associações entre mutações do gene *SPATA5L1* com a classe da nefrite lúpica, gravidade de doença e início precoce de apresentação.

### 5.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA *SPATA5L1* EM GLOMÉRULOS E TÚBULOS DE PACIENTES LÚPICOS COM NEFRITE LÚPICA, EM RIM NORMAL E EM PACIENTES COM SÍNDROME NEFRÓTICA.

Todas as amostras de tecido renal com nefrite lúpica apresentaram aumento da expressão da proteína *SPATA5L1* tanto em glomérulos quanto em túbulos. Quando comparadas com as amostras de tecidos renais normais, essa expressão foi mais intensa (Figura 9), apresentando significância estatística ( $p < 0,01$ ).

Para avaliar se a expressão da proteína *SPATA5L1* estava aumentada somente nos casos de nefrite lúpica ou em outras doenças renais, foi avaliada a expressão dessa proteína em oito amostras de tecidos renais de seis pacientes pediátricos com diagnóstico de síndrome nefrótica. Nessas amostras também foi visto um aumento da expressão proteica, apresentando igualmente significância estatística quando comparada com a expressão da proteína nas amostras de rins normais ( $p < 0,01$ ) (Figura 9). A intensidade de expressão da proteína nas amostras de nefrite lúpica e síndrome nefrótica não foi diferente estatisticamente ( $p = 0,19$ ). Estes dados estão especificados na tabela 7.

**Figura 10:** Figura representativa da expressão da proteína SPATA5L1 em amostras de tecidos renais com síndrome nefrótica (A), nefrite lúpica (B) e rim normal (C)



Fonte: autoria própria.

Observa-se maior expressão da proteína SPATA5L1 nos tecidos renais com síndrome nefrótica e nefrite lúpica, tanto em glomérulos quanto em túbulos, quando comparados com as amostras de rim normal.

**Tabela 7:** Comparação entre as amostras renais de nefrite lúpica, síndrome nefrótica e rins normais em relação à expressão da proteína SPATA5L1 nos túbulos e glomérulos

Tecido renal	Expressão em túbulos			Expressão em glomérulos		
	Diferença entre médias	IC95%	p-valor*	Diferença entre médias	IC95%	p-valor*
NL x SN	-0,03	(0,09;0,02)	0,19	0,02	(-0,03;0,07)	0,46
NL X RN	0,15	(0,08;0,23)	<0,01	0,16	(0,09;0,23)	<0,01
SN X RN	0,19	(0,10;0,27)	<0,01	0,14	(0,09;0,23)	<0,01

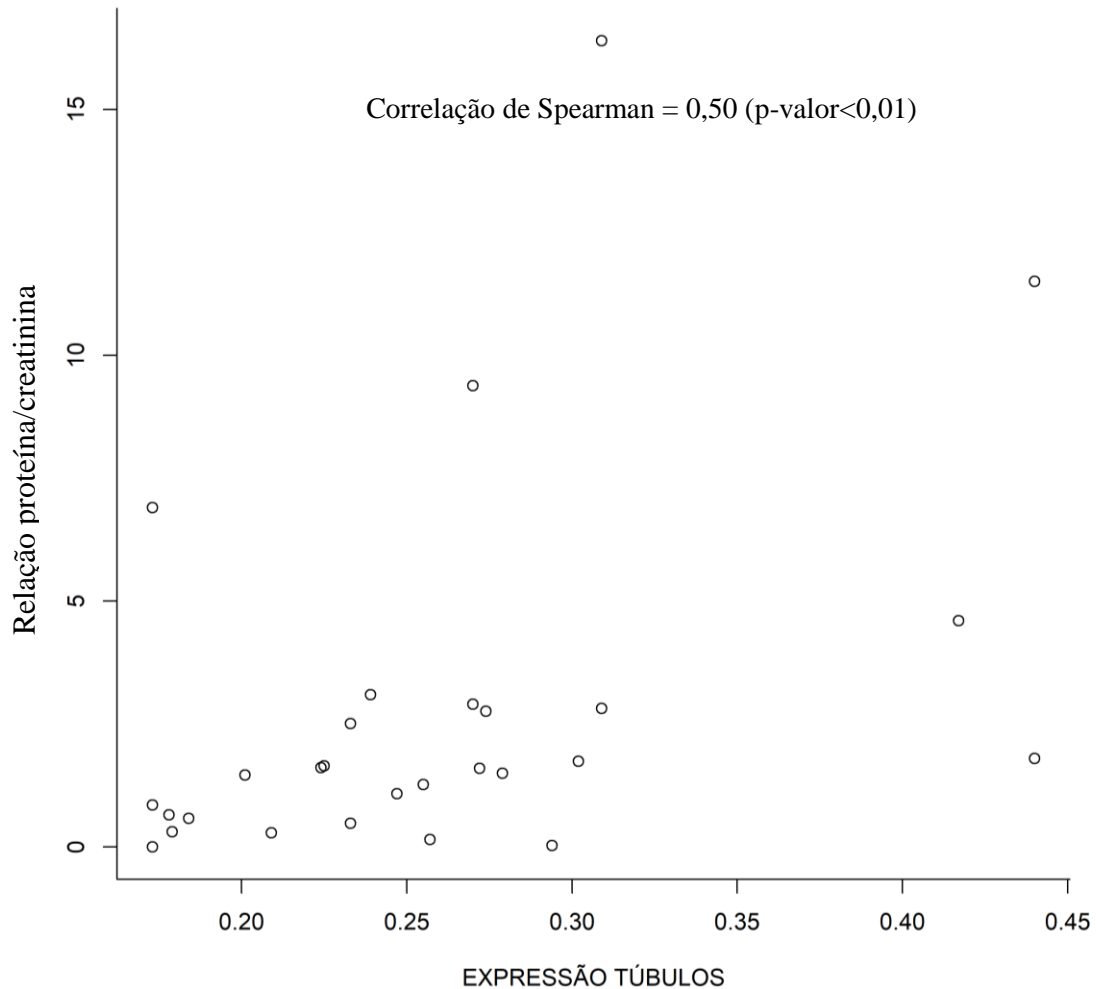
Fonte: autoria própria.

\*ANNOVA

NL: Nefrite lúpica; SN: Síndrome nefrótica; RN: Rim normal; IC: intervalo de confiança

Quando avaliada a expressão da proteína SPATA5L1, nas amostras de nefrite lúpica, em relação às alterações laboratoriais e histológicas apresentadas pelos pacientes, foi observada uma correlação positiva entre a relação proteína creatinina na amostra urinária e a expressão da proteína nos túbulos renais ( $p < 0,01$ ) (Figura 10). Tal associação não foi observada entre a relação proteína creatinina na amostra urinária e a expressão da proteína em glomérulos (Coeficiente de correlação de Spearman = -0,16;  $p = 0,42$ ). Também não foram encontradas associações da intensidade de expressão da proteína com provas de atividade inflamatória, índices de SLEDAI (Tabela 8) e BILAG, (Tabela 9), clearance de creatinina, classe histológica da nefrite lúpica, níveis de proteinúria nefrótica ou não e índice de atividade e cronicidade da biópsia renal (Tabela 10).

**Figura 11:** Correlação entre o nível de relação proteína e creatinina na amostra de urina e a expressão da proteína SPATA5L1 observada nos túbulos das biópsias renais dos pacientes com nefrite lúpica



Fonte: Autoria própria.

**Tabela 8:** Correlações entre as variáveis de marcadores inflamatórios (PCR e VHS) e SLEDAI-2K com a expressão da proteína SPATA5L1 nos túbulos e glomérulos dos pacientes com nefrite lúpica.

Variáveis	Expressão em túbulos	Expressão em glomérulos
Proteína C reativa	Rho = -0,16 (p = 0,47)	Rho = 0,36 (p = 0,09)
Velocidade de Hemossedimentação	Rho = -0,09 (p = 0,70)	Rho = -0,23 (p = 0,33)
SLEDAI-2K	Rho = 0,04 (p = 0,87)	Rho = 0,007 (p = 0,97)

Fonte: autoria própria.

Rho: Coeficiente de correlação de Spearman. SLEDAI-2K: Índice de atividade de doença do lúpus eritematoso sistêmico

**Tabela 9:** Comparação entre as categorias A, B e C do índice de atividade de doença BILAG em relação à expressão da proteína SPATA5L1 nos túbulos e glomérulos dos tecidos renais de pacientes com nefrite lúpica.

Índices	Expressão em túbulos			Expressão em glomérulos		
	Diferença entre médias	IC95%	p-valor*	Diferença entre médias	IC95%	p-valor*
<b>A - B</b>	0,08	(-0,02;0,19)	0,12	0,01	(-0,08;0,11)	0,76
<b>A - C</b>	-0,04	(-0,12;0,04)	0,31	-0,06	(-0,13;0,006)	0,07
<b>B - C</b>	-0,12	(-0,25;0,001)	0,05	-0,08	(-0,19;0,03)	0,16

Fonte: autoria própria.

\*ANOVA; IC: Intervalo de confiança;

A-B: Comparação entre os índices A (Doença ativa que exige uso de droga modificadora de doença (imunossupressor ou prednisolona > 20mg/d) e B (Doença menos ativa que em “A”: problemas reversíveis que exigem apenas terapia sintomática como antimaláricos, antiinflamatório não hormonal ou prednisolona < 20mg/d);

A-C: Comparação entre os índices A (Doença ativa que exige uso de droga modificadora de doença (imunossupressor ou prednisolona > 20mg/d) e C (Doença leve estável)

B-C: Comparação entre os índices B ( Doença menos ativa que em “A”: problemas reversíveis que exigem apenas terapia sintomática como antimaláricos, antiinflamatório não hormonal ou prednisolona < 20mg/d) e C (Doença leve estável).

**Tabela 10:** Avaliação das variáveis laboratoriais e histológicas relacionadas ao rim em relação à expressão da proteína SPATA5L1 nos túbulos e glomérulos dos tecidos renais de pacientes com nefrite lúpica

Variáveis	Expressão em túbulos			Expressão em glomérulos		
	Diferença entre as médias	Intervalo de confiança 95%	p-valor	Diferença entre as médias	Intervalo de Confiança 95%	p-valor
<b>Taxa de filtração glomerular*</b>						
Normal x Alterada <sup>1</sup>	-0,03	(-0,12;0,06)	0,43	-0,006	(-0,08;0,07)	0,88
<b>Classe histológica da biópsia renal**</b>						
A x B <sup>2</sup>	-0,007	(-0,07;0,06)	0,84	0,03	(-0,03;0,09)	0,36
A x C <sup>3</sup>	-0,04	(-0,12;0,05)	0,37	0,04	(-0,03;0,12)	0,19
B x C <sup>4</sup>	-0,03	(-0,11;0,04)	0,39	0,02	(-0,04;0,09)	0,51
<b>Índice de atividade**</b>						
Alto x Baixo <sup>5</sup>	0,02	(-0,04;0,08)	0,52	-0,01	(-0,07;0,05)	0,73
<b>Índice de cronicidade**</b>						
Presente x Ausente <sup>6</sup>	-0,01	(-0,07;0,05)	0,75	-0,02	(-0,08;0,04)	0,53
<b>Proteinúria nefrótica**</b>						
Sim x Não <sup>7</sup>	-0,05	(-0,11;0,004)	0,07	0,01	(-0,04;0,07)	0,57

Fonte: autoria própria.

\* teste t de Student; \*\* ANOVA

<sup>1</sup>Comparação entre a taxa de filtração glomerular normal ( $\geq 90$ ml/min/1.73m<sup>2</sup>) e alterada (<90ml/min/1.73m<sup>2</sup>)

<sup>2</sup>Comparação entre as classes histológicas da biópsia renal segundo a classificação ISN/RPS I,II,III (A) e IV (B)

<sup>3</sup>Comparação entre as classes histológicas da biópsia renal segundo a classificação ISN/RPS I,II,III (A) e V (C)

<sup>4</sup>Comparação entre as classes histológicas da biópsia renal segundo a classificação ISN/RPS IV (B) e V (C)

<sup>5</sup>Comparação entre o índice de atividade da biópsia renal alto (>12) e baixo (<12)

<sup>6</sup>Comparação entre o índice de cronicidade da biópsia renal presente e ausente

<sup>7</sup>Comparação entre o nível de proteinúria nefrótica (relação proteína/ creatinina>2mg/ml) ou não nefrótica (relação proteína/ creatinina<2mg/ml)

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos o gene *SPATA5L1* em 45 paciente com LESc, na maioria do gênero feminino, de cor branca e com início da doença após a puberdade. Encontramos uma frequência de variantes nesse gene de 60%, sendo que vinte e seis pacientes apresentaram polimorfismos intrônicos e uma paciente apresentou uma variante *missense*.

As características clínicas e laboratoriais apresentadas pelos pacientes do estudo, com exceção da maior frequência da cor branca, são semelhantes às descritas na literatura (DRENKARD; LIM, 2019; FORTUNA; BRENNAN, 2013; HENDRICKS, 2012). Com resultados semelhantes, no Brasil, Gomes et al, demonstraram uma frequência de 70% de pacientes da cor branca, em uma grande coorte de 847 pacientes com LESc, apesar de termos uma população miscigenada (GOMES *et al.*, 2016). As diferentes metodologias dos estudos para avaliação de cor, raça e etnia podem justificar a diferença de frequência dessa variável. No nosso estudo, a cor da pele foi autodeclarada, o que pode ser uma limitação com relação a este dado.

Uma revisão feita por Goulielmos *et al* (2018), revela que o LES é mais prevalente em afroamericanos, asiáticos e hispânicos em comparação com europeus, e que afroamericanos têm risco três a cinco vezes maior de desenvolver LES quando comparados com indivíduos de ascendência europeia. A nefrite lúpica também é mais incidente nessas populações, que costumam ter doença com idade de início mais precoce e mais grave. Além disso, a ascendência africana aumenta a probabilidade de produção de autoanticorpos (GOULIELMOS *et al.*, 2018).

Dados brasileiros, oriundos de um estudo multicêntrico retrospectivo realizado por Fiorot *et al.* (2019), que incluiu 1537 pacientes com LESc, confirmaram que pacientes afro-latino-americanos apresentam maior frequência de autoanticorpos, como antifosfolípedes, quando comparados com caucasianos. Entretanto, não demonstraram diferença com relação à gravidade e idade de início de doença entre pacientes afro-latino-americanos e caucasianos. Uma explicação para essa diferença pode ser a intensa miscigenação da população brasileira que possivelmente minimizou o espectro de diversidade racial desses pacientes (FIOROT *et al.*, 2019).

Dessa forma, estudos de variações genéticas, incluindo polimorfismos são importantes para responder questões sobre o comportamento da doença na nossa população.

Com relação às variantes identificadas no nosso estudo (rs12440038 e rs16943025), chama atenção o fato de serem mais frequentes na população africana e da Ásia Oriental<sup>6</sup>, assim como o LES é mais frequente e tem curso mais grave nessas populações (BARBER *et al.*, 2021; DÖRNER; FURIE, 2019).

Sabemos que algumas variantes estão relacionadas a alterações proteicas com potencial para causar doença (RAMÍREZ-BELLO; JIMÉNEZ-MORALES, 2017; SHASTRY, 2009; SOREMEKUN; SOLIMAN, 2019). Os polimorfismos são variações genéticas que, em alguns casos, também podem conferir alteração nas atividades regulatórias do gene e, conseqüentemente, levar a modificações na expressão gênica e/ou proteica. Em outros casos, algumas variantes podem ser neutras no genoma, sem provocar efeito danoso, ou alterar a função do gene ou não serem codificadas, como geralmente acontece quando estão nos íntrons (ALARCÓN-RIQUELME, 2006; PASTINEN; GE; HUDSON, 2006). Porém, se essas variantes, mesmo em regiões intrônicas, estão localizadas em sítios de regulação que envolve *splicing* alternativo, tipo retenção de íntrons, também podem ocasionar modificações no RNA mensageiro e na expressão da proteína (ZHENG *et al.*; 2020).

A variante intrônica rs12440038, foi presente em 55% dos pacientes no nosso estudo e tem ocorrência populacional de 45%<sup>7</sup>. Não foi possível avaliar as associações desse polimorfismo com o LESc, visto termos um número pequeno de pacientes para avaliação de polimorfismos e pela ausência de um grupo controle, sem doença, da mesma população. Mas esse polimorfismo, de alta frequência, apesar de localizado em íntron, será objeto de estudos posteriores com recrutamento de outros centros envolvidos nos cuidados desses pacientes e grupo controle pareado.

A paciente portadora da variante *missense* do *SPATA5L1*, (rs16943025 - com frequência na população em geral de 1%) desenvolveu LES antes da puberdade e apresentou nefrite lúpica classe IV como manifestação inicial. Essa variante foi capaz de prolongar a estabilidade da proteína em relação à proteína nativa nos estudos de dinâmica molecular. Como apenas uma paciente apresentou a variante *missense*, não conseguimos realizar estudos de associação com gravidade e idade de início de doença, apesar da paciente em questão apresentar nefrite lúpica grave e desenvolvimento pré-puberal do LES.

Anteriormente a esse estudo, descrevemos que uma variante *missense* no gene *SPATA5L1* esteve associada a quadro de nefrite lúpica em uma criança de nove meses de idade, que ainda não tinha desenvolvido os critérios imunológicos da doença, ou seja, a

<sup>6</sup> Disponível em: <https://www.ensembl.org>. Acesso em: 31 dez. 2022.

<sup>7</sup> Disponível em: <https://www.ensembl.org>. Acesso em: 31 dez. 2022.



presença de autoanticorpos séricos incluindo ANA (DE CARVALHO *et al.*; 2022), sendo o motivo do interesse em investigar a presença de variante com potencial patogênico no LESC e a expressão dessa proteína nesses pacientes.

Apesar da paciente descrita por de Carvalho et al, até o momento da publicação, não apresentar ANA positivo, o padrão renal indiferenciável de nefrite lúpica, diagnosticada aos nove meses de idade, sugere uma possibilidade de o gene estar envolvido com a patogênese do LES monogênico. Massias *et al.*, relataram uma frequência semelhante de nefrite lúpica em pacientes que iniciaram a doença em período pré-puberal e pós-puberal, porém os pacientes do primeiro grupo, principalmente os abaixo de 7 anos, tinham taxas mais altas de ANA negativo (14%) quando comparados com os pacientes com o início após a puberdade. Essa alta frequência de ANA negativo apresentada nesse estudo, bem como em nossa paciente do estudo anterior, levanta a hipótese que nesses pacientes ocorra um fenótipo mais associado à imunidade inata, e consequentemente, mais associado ao LES monogênico e às interferonopatias tipo 1 (MASSIAS *et al.*, 2020). Outra possibilidade, é que as manifestações iniciais do LES podem preceder em anos a presença de anticorpos séricos, o que pode também explicar a ausência desses anticorpos (GIANVITI *et al.*, 1999; WEN; CHEN, 2010). Até o momento não temos descrição de LES monogênico associado à variantes patogênicas do *SPATA5L1*, sendo os genes mais associados ao desenvolvimento do LES monogênico os relacionados ao sistema complemento (ALPERIN; ORTIZ-FERNÁNDEZ; SAWALHA, 2018).

Poucos são os estudos publicados que associam possíveis fenótipos ao gene *SPATA5L1*. As publicações até o momento são estudos de GWAS associando alguns SNPs localizados no *SPATA5L1* com doença renal crônica e taxa de filtração glomerular, ou relatos de caso em que variantes do *SPATA5L1* e do *SPATA5* foram associadas a fenótipos como paralisia cerebral, epilepsia (RICHARD *et al.*, 2021) e perda auditiva (BRAUN *et al.*, 2021; OESCH; BOZARTH, 2020; PUUSEPP; KOVACS-NAGY *et al.*, 2018; ZANUS *et al.*, 2020). O mais recente é o relato prévio de nossa autoria associando uma variante missense do gene *SPATA5L1* com nefrite lúpica “full-house” (DE CARVALHO *et al.*, 2022). Sendo assim, este é o primeiro estudo que avalia o gene *SPATA5L1* em um grupo de pacientes portadores de LESC.

Apesar de poucos estudos de interesse ao gene até o momento, as possíveis interações da sua proteína com proteínas do complexo proteassoma e proteínas com potenciais funções

relacionadas ao ciclo celular e controle de apoptose<sup>8</sup> tornam o *SPATA5L1* promissor na regulação de doenças imunes como o LESc.

Autoantígenos, alvos em doenças autoimunes sistêmicas, como o LES, estão frequentemente associados a processos celulares ativos, como divisão celular, proliferação ou transcrição. Além disso, o processamento de autoantígenos é feito por proteossomas nucleares, que podem gerar um processamento alterado de antígeno, através da geração de altos níveis de peptídeos antigênicos e/ou alteração da estrutura antigênica, de modo que epítomos previamente crípticos sejam expostos e reconhecidos erroneamente como *non-self* pelas células T, iniciando uma resposta autoimune sistêmica (CHEN; VON MIKECZ, 2005).

O presente estudo encontrou aumento da expressão da proteína SPATA5L1 em glomérulos e túbulos de pacientes com nefrite lúpica em relação a rins normais, independente de variantes no gene. Não há trabalhos publicados avaliando a expressão proteica do gene *SPATA5L1* em amostras de nefrite lúpica, entretanto, quando acessamos bancos de dados publicamente disponíveis no Gene Expression Omnibus (GEO), provenientes de amostras humanas diagnosticadas com nefrite lúpica, encontramos que a expressão gênica do *SPATA5L1* também está aumentada em relação a biópsias de rins normais, sugerindo algum papel do gene na patogênese da doença.

Estudamos também biópsias de pacientes com síndrome nefrótica idiopática da infância com o objetivo de determinar se a maior expressão renal da proteína SPATA5L1 era exclusiva de pacientes com LESc. Nesses pacientes a expressão da proteína foi igualmente aumentada em relação ao controle e sem diferença estatística em relação aos pacientes com LES. Isso levanta a hipótese que este gene não esteja especificamente envolvido no LESc, mas também em outras doenças autoimunes ou inflamatórias. Dessa forma, a expressão dessa proteína poderia ser consequência do processo inflamatório intenso, atuando como um biomarcador, e não um desencadeador de doença. Ou seja, hipoteticamente, essa seria uma proteína relacionada à inflamação, visto que em rins inflamados sua expressão é aumentada em relação à rins não inflamados. A outra possibilidade é que as duas doenças estejam em um mesmo espectro fisiopatológico. Têm sido descritos casos de pacientes portadores de LES que apresentam síndrome nefrótica e achados na biópsia renal compatíveis com glomérulos normais ou lesões de glomerulosclerose segmentar focal, que são achados clássicos de SNI. Esse quadro é denominado podocitopatia lúpica (OLIVA-DAMASO *et al.*, 2019). Por outro lado, já foram descritos casos de pacientes com SNI que desenvolveram LES posteriormente

---

<sup>8</sup> Disponível em: <https://metascape.org/gp/index.html#/reportfinal/trr2jdvex>. Acesso em: 18 nov. 2022.

(HERTIG *et al.*, 2002). A avaliação da expressão da proteína em outros grupos de doenças, seria necessária para resposta a esta questão.

Não houve associação da expressão renal da proteína SPATA5L1 com a classe da nefrite lúpica dos pacientes e com a gravidade e/ou atividade do LES e nefrite lúpica. Porém, quando avaliamos a expressão da proteína nos túbulos renais, essa apresentou associação positiva com a relação entre a proteína e a creatina na amostra urinária ( $p < 0,01$ ), o que não foi observado em relação à expressão proteica em glomérulos.

Sabemos que a filtração anormal de proteínas pelos glomérulos, principalmente a albumina, a qual é predominante no filtrado glomerular, gera uma toxicidade renal ligada à super reabsorção das proteínas do filtrado glomerular por células tubulares proximais, induzindo a inflamação túbulo-intersticial, fibrose e apoptose das células tubulares, mas os mecanismos subjacentes permanecem amplamente desconhecidos (WANG *et al.*, 2015). Sabemos também que a lesão tubulointersticial, especificamente a fibrose intersticial e a atrofia tubular (FIAT), é um preditor confiável da progressão para a DRC, independentemente da extensão do dano glomerular (WANG *et al.*, 2022).

Há evidências de que a sobrecarga proteica das células tubulares proximais, em cultura, ativa a transcrição de vários genes que codificam moléculas vasoativas, inflamatórias e fibrogênicas com um potencial efeito tóxico nos rins (ZOJA; MORIGI; REMUZZI, 2003).

Visto que estudos anteriores relacionaram SNPs do *SPATA5L1* com DRC (KOTTGEN *et al.*, 2009; KOTTGEN *et al.*, 2010; KUBO *et al.*, 2017), uma possível explicação para a associação positiva encontrada em nosso estudo pode ser que a proteína SPATA5L1 tenha uma ação de sinalização da intensa cascata inflamatória e reparativa nessa zona renal. Uma hipótese é que a albumina em alta concentração possa atuar na regulação positiva de genes pró-inflamatório, fibrogênicos e apoptóticos, nas células dos túbulos proximais, entre eles o *SPATA5L1*.

Nosso estudo foi pioneiro no que tange a avaliação do gene *SPATA5L1* e sua expressão renal em pacientes lúpicos, sugerindo que, de alguma forma, o gene *SPATA5L1* pode estar associado ao LES.

Como limitação deste estudo podemos citar o número pequeno de pacientes incluídos, visto serem pacientes de centro único. O recrutamento de número maior de pacientes com diagnóstico de LESc, em estudos multicêntricos, e de um grupo controle sem doença, possibilitaria que fossem feitas associações em relação aos polimorfismos intrônicos observados neste estudo e aumentaria a possibilidade do encontro de mais variantes de potencial patogênico para avaliação da associação destas variantes com a gravidade do LES

e da nefrite lúpica e com o início precoce da doença. Outra limitação foi a não comparação das biópsias de rins de pacientes lúpicos e com SNI com outros grupos de doenças renais, para avaliação da especificidade do achado para as duas doenças.

Esperamos que esse estudo estimule a realização de estudos prospectivos e de genômica funcional, incluindo número maior de pacientes e grupo controle de outras doenças renais e sem doença, na tentativa de comprovação da relação entre o gene *SPATA5L1* e o LES.

## 7 CONCLUSÕES

1. O presente estudo constatou uma alta frequência de variantes no gene *SPATA5L1* (60%) em pacientes com diagnóstico de LESC, sendo, em sua maioria, polimorfismos intrônicos.
2. Não foi possível estabelecer a associação entre mutações do gene *SPATA5L1* com a classe da nefrite lúpica, gravidade de doença e início precoce de apresentação, devido a ocorrência de uma variante *missense* em apenas 1 paciente.
3. A expressão renal da proteína SPATA5L1 foi aumentada em glomérulos e túbulos de todas as amostras de tecidos com nefrite lúpica, assim como nas amostras de tecidos com síndrome nefrótica idiopática da infância, quando comparadas com as amostras de tecidos renais normais, havendo significância estatística entre a expressão proteica nos rins com NL e rins normais ( $p < 0,01$ ) e entre a expressão proteica nos rins com SNI e rins normais ( $p < 0,01$ ). Não houve significância entre a expressão proteica nos rins com NL e rins com SNI.
4. Foi observada uma correlação positiva entre a relação proteína creatinina na amostra urinária e a expressão da proteína nos túbulos renais ( $p < 0,01$ ), o que não foi observado entre a relação proteína creatinina na amostra urinária e a expressão da proteína nos glomérulos.
5. Não foram encontradas associações da intensidade de expressão da proteína com provas de atividade inflamatória, índices de SLEDAI e BILAG, clearance de creatinina, classe histológica da nefrite lúpica, níveis de proteinúria nefrótica e índice de atividade e cronicidade da biópsia renal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALARCÓN-RIQUELME, M. E. The genetics of systemic lupus erythematosus: understanding how SNPs confer disease susceptibility. **Springer Semin Immunopathol**, 28, n. 2, p. 109-117, Oct 2006.
- ALMAANI, S.; PROKOPEC, S. D.; ZHANG, J.; YU, L. *et al.* Rethinking Lupus Nephritis Classification on a Molecular Level. **J Clin Med**, 8, n. 10, Sep 23 2019.
- ALPERIN, J. M.; ORTIZ-FERNÁNDEZ, L.; SAWALHA, A. H. Monogenic Lupus: A Developing Paradigm of Disease. **Front Immunol**, 9, p. 2496, 2018.
- ANDERS, H. J.; SAXENA, R.; ZHAO, M. H.; PARODIS, I. *et al.* Lupus nephritis. **Nat Rev Dis Primers**, 6, n. 1, p. 7, Jan 23 2020.
- ARINGER, M.; COSTENBADER, K.; DAIKH, D.; BRINKS, R. *et al.* 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, 78, n. 9, p. 1151-1159, Sep 2019.
- ARORA, S.; ISENBERG, D. A.; CASTREJON, I. Measures of Adult Systemic Lupus Erythematosus: Disease Activity and Damage. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, 72 Suppl 10, p. 27-46, Oct 2020.
- AUSTIN, H. A., 3rd; MUENZ, L. R.; JOYCE, K. M.; ANTONOVYCH, T. T. *et al.* Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome. **Kidney Int**, 25, n. 4, p. 689-695, Apr 1984.
- BARBER, M. R. W.; DRENKARD, C.; FALASINNU, T.; HOI, A. *et al.* Global epidemiology of systemic lupus erythematosus. **Nat Rev Rheumatol**, 17, n. 9, p. 515-532, Sep 2021.
- BATU, E. D. Monogenic systemic lupus erythematosus: insights in pathophysiology. **Rheumatol Int**, 38, n. 10, p. 1763-1775, Oct 2018.
- BERTHIER, C. C.; BETHUNAICKAN, R.; GONZALEZ-RIVERA, T.; NAIR, V. *et al.* Cross-species transcriptional network analysis defines shared inflammatory responses in murine and human lupus nephritis. **J Immunol**, 189, n. 2, p. 988-1001, Jul 15 2012.
- BRAUN, F.; HENTSCHEL, A.; SICKMANN, A.; MARTEAU, T. *et al.* Muscular and Molecular Pathology Associated with SPATA5 Deficiency in a Child with EHLERS-DANLOS SYNDROME. **Int J Mol Sci**, 22, n. 15, Jul 22 2021.
- CAMERON, J. S. Lupus nephritis. **J Am Soc Nephrol**, 10, n. 2, p. 413-424, Feb 1999.
- CHEN, L.; MORRIS, D. L.; VYSE, T. J. Genetic advances in systemic lupus erythematosus: an update. **Curr Opin Rheumatol**, 29, n. 5, p. 423-433, Sep 2017.
- CHEN, M.; VON MIKECZ, A. Proteasomal processing of nuclear autoantigens in systemic autoimmunity. **Autoimmun Rev**, 4, n. 3, p. 117-122, Mar 2005.

- CODY, E. M.; BRUNNER, H. I. Biomarkers in Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus. **Rheum Dis Clin North Am**, 48, n. 1, p. 271-285, Feb 2022.
- COSTA-REIS, P.; SULLIVAN, K. E. Monogenic lupus: it's all new! **Curr Opin Immunol**, 49, p. 87-95, Dec 2017.
- DE CARVALHO, L. M.; DE SOUSA, G. R.; MOURA, R.; SAGGIORO, F. *et al.* Full-house nephropathy associated with high expression of SPATA5L1 due to a genetic pathogenic variant. **Rheumatology (Oxford)**, 61, n. 4, p. e84-e86, Apr 11 2022.
- DEMIRKAYA, E.; SAHIN, S.; ROMANO, M.; ZHOU, Q. *et al.* New Horizons in the Genetic Etiology of Systemic Lupus Erythematosus and Lupus-Like Disease: Monogenic Lupus and Beyond. **J Clin Med**, 9, n. 3, Mar 5 2020.
- DÖRNER, T.; FURIE, R. Novel paradigms in systemic lupus erythematosus. **Lancet**, 393, n. 10188, p. 2344-2358, Jun 8 2019.
- DRENKARD, C.; LIM, S. S. Update on lupus epidemiology: advancing health disparities research through the study of minority populations. **Curr Opin Rheumatol**, 31, n. 6, p. 689-696, Nov 2019.
- FIOROT, F. J.; ISLABÃO, A. G.; PEREIRA, R. M.; TERRERI, M. T. *et al.* Disease presentation of 1312 childhood-onset systemic lupus erythematosus: influence of ethnicity. **Clin Rheumatol**, 38, n. 10, p. 2857-2863, Oct 2019.
- FORTUNA, G.; BRENNAN, M. T. Systemic lupus erythematosus: epidemiology, pathophysiology, manifestations, and management. **Dent Clin North Am**, 57, n. 4, p. 631-655, Oct 2013.
- GHODKE-PURANIK, Y.; NIEWOLD, T. B. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. **J Autoimmun**, 64, p. 125-136, Nov 2015.
- GIANVITI, A.; BARSOTTI, P.; BARBERA, V.; FARAGGIANA, T. *et al.* Delayed onset of systemic lupus erythematosus in patients with "full-house" nephropathy. **Pediatr Nephrol**, 13, n. 8, p. 683-687, Oct 1999.
- GLADMAN, D.; GINZLER, E.; GOLDSMITH, C.; FORTIN, P. *et al.* The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, 39, n. 3, p. 363-369, Mar 1996.
- GLADMAN, D. D.; IBÁÑEZ, D.; UROWITZ, M. B. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. **J Rheumatol**, 29, n. 2, p. 288-291, Feb 2002.
- GOMES, R. C.; SILVA, M. F.; KOZU, K.; BONFÁ, E. *et al.* Features of 847 Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus Patients in Three Age Groups at Diagnosis: A Brazilian Multicenter Study. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, 68, n. 11, p. 1736-1741, Nov 2016.

GOULIELMOS, G. N.; ZERVOU, M. I.; VAZGIOURAKIS, V. M.; GHODKE-PURANIK, Y. *et al.* The genetics and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) in populations of different ancestry. **Gene**, 668, p. 59-72, Aug 20 2018.

GROOT, N.; DE GRAEFF, N.; AVCIN, T.; BADER-MEUNIER, B. *et al.* European evidence-based recommendations for diagnosis and treatment of childhood-onset systemic lupus erythematosus: the SHARE initiative. **Ann Rheum Dis**, 76, n. 11, p. 1788-1796, Nov 2017.

HAY, E. M.; BACON, P. A.; GORDON, C.; ISENBERG, D. A. *et al.* The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. **Q J Med**, 86, n. 7, p. 447-458, Jul 1993.

HENDRICKS, C. O. Patients with lupus: an overview of culturally competent practice. **Soc Work Health Care**, 51, n. 7, p. 640-651, 2012.

HERTIG, A.; DROZ, D.; LESAVRE, P.; GRÜNFELD, J. P. *et al.* SLE and idiopathic nephrotic syndrome: coincidence or not? **Am J Kidney Dis**, 40, n. 6, p. 1179-1184, Dec 2002.

HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, 40, n. 9, p. 1725, Sep 1997.

JAMALY, S.; RAKAEE, M.; ABDI, R.; TSOKOS, G. C. *et al.* Interplay of immune and kidney resident cells in the formation of tertiary lymphoid structures in lupus nephritis. **Autoimmun Rev**, 20, n. 12, p. 102980, Dec 2021.

KANT, S.; KRONBICHLER, A.; SHARMA, P.; GEETHA, D. Advances in Understanding of Pathogenesis and Treatment of Immune-Mediated Kidney Disease: A Review. **Am J Kidney Dis**, 79, n. 4, p. 582-600, Apr 2022.

KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases. **Kidney Int**, 100, n. 4s, p. S1-s276, Oct 2021.

KLUMB, E. M.; SILVA, C. A. A.; LANNA, C. C. D.; SATO, E. I. *et al.* Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o diagnóstico, manejo e tratamento da nefrite lúpica. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 55, n. 1, p. 1-21, 2015-02 2015.

KOTTGEN, A.; GLAZER, N. L.; DEHGHAN, A.; HWANG, S. J. *et al.* Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. **Nat Genet**, 41, n. 6, p. 712-717, Jun 2009.

KOTTGEN, A.; PATTARO, C.; BOGER, C. A.; FUCHSBERGER, C. *et al.* New loci associated with kidney function and chronic kidney disease. **Nat Genet**, 42, n. 5, p. 376-384, May 2010.

KOUTSONIKOLI, A.; TRACHANA, M.; FARMAKI, E.; TZIMOULI, V. *et al.* Novel biomarkers for the assessment of paediatric systemic lupus erythematosus nephritis. **Clin Exp Immunol**, 188, n. 1, p. 79-85, Apr 2017.



KUBO, Y.; IMAIZUMI, T.; ANDO, M.; NAKATOCHI, M. *et al.* Association between kidney function and genetic polymorphisms in atherosclerotic and chronic kidney diseases: A cross-sectional study in Japanese male workers. **PLoS One**, 12, n. 10, p. e0185476, 2017.

KWON, Y. C.; CHUN, S.; KIM, K.; MAK, A. Update on the Genetics of Systemic Lupus Erythematosus: Genome-Wide Association Studies and Beyond. **Cells**, 8, n. 10, Sep 30 2019.

LEVIN, A. S., Paul E.; Bilous, Rudy W.; Coresh, Josef; De Francisco, Angel L.M.; De Jong, Paul E.; Griffith, Kathryn E.; Hemmelgarn, Brenda R.; Iseki, Kunitoshi; Lamb, Edmund J.; Levey, Andrew S.; Riella, Miguel C.; Shlipak, Michael G.; Wang, Haiyan White, Colin T. Winearls, Christopher G. Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) CKD work group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. **Kidney International Supplements**, 3, n. 1, p. 1-150, 2013.

LI, H.; BOULOUGOURA, A.; ENDO, Y.; TSOKOS, G. C. Abnormalities of T cells in systemic lupus erythematosus: new insights in pathogenesis and therapeutic strategies. **J Autoimmun**, 132, p. 102870, Oct 2022.

LINO, M.C.; COSTA, R.S.; GOMES FHR; LOURENÇO E.M.; MACHADO I.C.; FACINCANI. Síndrome nefrótica idiopática com lesão glomerular mínima na infância e nefrite lúpica classe V na adolescência: relato de caso. *In: XXX CONGRESSO BRASILEIRO DE NEFROLOGIA, XII CONGRESSO LUSO-BRASILEIRO DE NEFROLOGIA*, 2020, Evento online.

LIVINGSTON, B.; BONNER, A.; POPE, J. Differences in clinical manifestations between childhood-onset lupus and adult-onset lupus: a meta-analysis. **Lupus**, 20, n. 13, p. 1345-1355, Nov 2011.

LO, M. S. Concepts in lupus pathophysiology: Lessons learned from disease across the spectrum. **Clin Immunol**, 238, p. 109021, May 2022.

LO, M. S.; TSOKOS, G. C. Recent developments in systemic lupus erythematosus pathogenesis and applications for therapy. **Curr Opin Rheumatol**, 30, n. 2, p. 222-228, Mar 2018.

MASSIAS, J. S.; SMITH, E. M. D.; AL-ABADI, E.; ARMON, K. *et al.* Clinical and laboratory characteristics in juvenile-onset systemic lupus erythematosus across age groups. **Lupus**, 29, n. 5, p. 474-481, Apr 2020.

MATSUNAMI, N.; HENSEL, C. H.; BAIRD, L.; STEVENS, J. *et al.* Identification of rare DNA sequence variants in high-risk autism families and their prevalence in a large case/control population. **Mol Autism**, 5, n. 1, p. 5, Jan 27 2014.

NI, C.; SCHMITZ, D. A.; LEE, J.; PAWŁOWSKI, K. *et al.* Labeling of heterochronic ribosomes reveals C1ORF109 and SPATA5 control a late step in human ribosome assembly. **Cell Rep**, 38, n. 13, p. 110597, Mar 29 2022.

OESCH, G.; BOZARTH, X. L. Rufinamide efficacy and association with phenotype and genotype in children with intractable epilepsy: A retrospective single center study. **Epilepsy Res**, 168, p. 106211, Dec 2020.

OLIVA-DAMASO, N.; PAYAN, J.; OLIVA-DAMASO, E.; PEREDA, T. *et al.* Lupus Podocytopathy: An Overview. **Adv Chronic Kidney Dis**, 26, n. 5, p. 369-375, Sep 2019.

OMARJEE, O.; PICARD, C.; FRACHETTE, C.; MOREEWS, M. *et al.* Monogenic lupus: Dissecting heterogeneity. **Autoimmun Rev**, 18, n. 10, p. 102361, Oct 2019.

PARIKH, S. V.; ALMAANI, S.; BRODSKY, S.; ROVIN, B. H. Update on Lupus Nephritis: Core Curriculum 2020. **Am J Kidney Dis**, 76, n. 2, p. 265-281, Aug 2020.

PARK, H.; KIM, H. J.; LEE, S.; YOO, Y. J. *et al.* A family-based association study after genome-wide linkage analysis identified two genetic loci for renal function in a Mongolian population. **Kidney Int**, 83, n. 2, p. 285-292, Feb 2013.

PASTINEN, T.; GE, B.; HUDSON, T. J. Influence of human genome polymorphism on gene expression. **Hum Mol Genet**, 15 Spec No 1, p. R9-16, Apr 15 2006.

PATERA, F.; CUDZICH-MADRY, A.; HUANG, Z.; FRAGIADAKI, M. Renal expression of JAK2 is high in polycystic kidney disease and its inhibition reduces cystogenesis. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 4491, Mar 14 2019.

PETRI, M.; ORBAI, A. M.; ALARCÓN, G. S.; GORDON, C. *et al.* Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, 64, n. 8, p. 2677-2686, Aug 2012.

PUUSEPP, S.; KOVACS-NAGY, R.; ALHADDAD, B.; BRAUNISCH, M. *et al.* Compound heterozygous SPATA5 variants in four families and functional studies of SPATA5 deficiency. **Eur J Hum Genet**, 26, n. 3, p. 407-419, Mar 2018.

RAMÍREZ-BELLO, J.; JIMÉNEZ-MORALES, M. [Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases]. **Gac Med Mex**, 153, n. 2, p. 238-250, Mar-Apr 2017.

RICHARD, E. M.; BAKHTIARI, S.; MARSH, A. P. L.; KAIYRZHANOV, R. *et al.* Bi-allelic variants in SPATA5L1 lead to intellectual disability, spastic-dystonic cerebral palsy, epilepsy, and hearing loss. **Am J Hum Genet**, 108, n. 10, p. 2006-2016, Oct 7 2021.

ROUSSEAU, A.; BERTOLOTTI, A. Regulation of proteasome assembly and activity in health and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 19, n. 11, p. 697-712, Nov 2018.

SAKAMOTO, A. P.; SILVA, C. A.; ISLABÃO, A. G.; NOVAK, G. V. *et al.* Chronic kidney disease in patients with childhood-onset systemic lupus erythematosus. **Pediatr Nephrol**, Nov 21 2022.

SANTANA-KRÍMSKAYA, S. E.; FRANCO-MOLINA, M. A.; ZÁRATE-TRIVIÑO, D. G.; PRADO-GARCÍA, H. *et al.* IMMUNEPOTENT CRP plus doxorubicin/cyclophosphamide chemotherapy remodel the tumor microenvironment in an air pouch triple-negative breast cancer murine model. **Biomed Pharmacother**, 126, p. 110062, Jun 2020.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Res**, 13, n. 11, p. 2498-2504, Nov 2003.

SHASTRY, B. S. SNPs: impact on gene function and phenotype. **Methods Mol Biol**, 578, p. 3-22, 2009.

SILVA, C. A.; AVCIN, T.; BRUNNER, H. I. Taxonomy for systemic lupus erythematosus with onset before adulthood. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, 64, n. 12, p. 1787-1793, Dec 2012.

SMITH, E. M. D.; LYTHGOE, H.; MIDGLEY, A.; BERESFORD, M. W. *et al.* Juvenile-onset systemic lupus erythematosus: Update on clinical presentation, pathophysiology and treatment options. **Clin Immunol**, 209, p. 108274, Dec 2019.

SOREMEKUN, O. S.; SOLIMAN, M. E. S. From genomic variation to protein aberration: Mutational analysis of single nucleotide polymorphism present in ULBP6 gene and implication in immune response. **Comput Biol Med**, 111, p. 103354, Aug 2019.

THANOU, A.; JUPE, E.; PURUSHOTHAMAN, M.; NIEWOLD, T. B. *et al.* Clinical disease activity and flare in SLE: Current concepts and novel biomarkers. **J Autoimmun**, 119, p. 102615, May 2021.

THIBAudeau, T. A.; SMITH, D. M. A Practical Review of Proteasome Pharmacology. **Pharmacol Rev**, 71, n. 2, p. 170-197, Apr 2019.

TRINDADE, V. C.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.; BONFA, E.; SILVA, C. A. An Update on the Management of Childhood-Onset Systemic Lupus Erythematosus. **Paediatr Drugs**, 23, n. 4, p. 331-347, Jul 2021.

VILAR, M. J.; SATO, E. I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). **Lupus**, 11, n. 8, p. 528-532, 2002.

VON MERING, C.; HUYNEN, M.; JAEGGI, D.; SCHMIDT, S. *et al.* STRING: a database of predicted functional associations between proteins. **Nucleic Acids Res**, 31, n. 1, p. 258-261, Jan 1 2003.

WANG, S.; WU, M.; CHIRIBOGA, L.; ZECK, B. *et al.* Membrane attack complex (MAC) deposition in renal tubules is associated with interstitial fibrosis and tubular atrophy: a pilot study. **Lupus Sci Med**, 9, n. 1, Jan 2022.

WANG, W.; CHENG, J.; SUN, A.; LV, S. *et al.* TRB3 mediates renal tubular cell apoptosis associated with proteinuria. **Clin Exp Med**, 15, n. 2, p. 167-177, May 2015.

WEN, Y. K.; CHEN, M. L. Clinicopathological study of originally non-lupus "full-house" nephropathy. **Ren Fail**, 32, n. 9, p. 1025-1030, 2010.

WENDERFER, S. E.; RUTH, N. M.; BRUNNER, H. I. Advances in the care of children with lupus nephritis. **Pediatr Res**, 81, n. 3, p. 406-414, Mar 2017.

ZANUS, C.; COSTA, P.; FALETRA, F.; MUSANTE, L. *et al.* Description of a peculiar alternating ictal electroclinical pattern in a young boy with a novel SPATA5 mutation. **Epileptic Disord**, 22, n. 5, p. 659-663, Oct 1 2020.

ZHENG, J. T.; LIN, C. X.; FANG, Z. Y.; LI, H. D. Intron Retention as a Mode for RNA-Seq Data Analysis. **Front Genet**, 11, p. 586, 2020.

ZHOU, Y.; ZHOU, B.; PACHE, L.; CHANG, M. *et al.* Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. **Nat Commun**, 10, n. 1, p. 1523, Apr 3 2019.

ZOJA, C.; MORIGI, M.; REMUZZI, G. Proteinuria and phenotypic change of proximal tubular cells. **J Am Soc Nephrol**, 14 Suppl 1, p. S36-41, Jun 2003.

ZUCCHI, D.; ELEFANTE, E.; SCHILIRÒ, D.; SIGNORINI, V. *et al.* One year in review 2022: systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol**, 40, n. 1, p. 4-14, Jan 2022.

**ANEXO 1 - CRITÉRIOS DO AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY PARA A CLASSIFICAÇÃO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (HOCHBERG, 1997).**

**CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO**

---

**1 ERITEMA MALAR**

**2 ERITEMA DISCÓIDE**

**3 FOTOSSENSIBILIDADE**

**4 ÚLCERAS DE MUCOSA (ORAL OU NASAL)**

**5 ARTRITE NÃO EROSIVA**

**6 SEROSITE (PLEURITE OU PERICARDITE)**

**7 DOENÇA RENAL:**

**A - PROTEINÚRIA PERSISTENTE OU SUPERIOR A 0,5G/DIA**

**B - CILINDRÚRIA: CILINDROS HEMÁTICOS, HEMOGLOBÍNICOS, GRANULARES, TUBULARES OU MISTOS**

**DOENÇA NEUROLÓGICA**

**A - PSICOSE (EXCLUINDO-SE DROGAS E DISTÚRBIOS METABÓLICOS)**

**B - CONVULSÃO (EXCLUINDO-SE DROGAS E DISTÚRBIOS METABÓLICOS)**

**DOENÇA HEMATOLÓGICA**

**A - ANEMIA HEMOLÍTICA COM RETICULOCITOSE EM DUAS OU MAIS OCASIÕES**

**B - LEUCOPENIA (LEUCÓCITOS MENOR QUE 4.000/MM<sup>3</sup>) EM DUAS OU MAIS OCASIÕES**

**C - PLAQUETOPENIA (PLAQUETAS MENOR QUE 100.000/MM<sup>3</sup>) EM DUAS OU MAIS OCASIÕES**

**D - LINFOPENIA (LINFÓCITOS MENOR QUE 1.500/MM<sup>3</sup>) EM DUAS OU MAIS OCASIÕES**

**8 ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS: ANTICORPO ANTI-DNA E/OU ANTICORPO**

**9 ANTI-SM E/OU ANTICORPO ANTIFOSFOLÍPIDE (ANTICARDIOLIPINA E/OU**

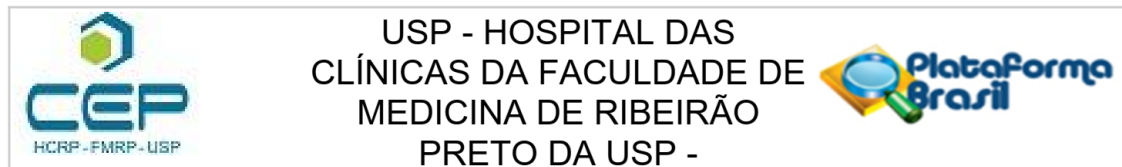
**10 ANTICOAGULANTE LÚPICO) IGG E/OU IGM E/OU VDRL FALSO-POSITIVO**

**11 FATOR ANTI-NÚCLEO (FAN) POSITIVO**

---

PARA O DIAGNÓSTICO É NECESSÁRIA A PRESENÇA DE 4 OU MAIS DOS 11 CRITÉRIOS, SIMULTANEAMENTE OU EVOLUTIVAMENTE, DURANTE QUALQUER INTERVALO DE TEMPO.

## ANEXO 2 – PARECER DO CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Associação de mutação do tipo missense no gene SPATA5L1 e gravidade de nefrite lúpica em crianças e adultos.

**Pesquisador:** PAOLA PINHEIRO KAHWAGE

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 14565119.4.0000.5440

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.458.351

#### Apresentação do Projeto:

Análise da mutação missense Ser273Cys no exon 1 do gene SPATSL1 em pacientes adultos e pediátricos portadores de LES tratados no HC-FMRP-USP.

Resumo:

O mRNA do gene SPATA5L1 (Spermatogenesis Associated 5 Like 1) está expresso em diferentes tecidos, entre eles no rim. Estudos de associação ampla do genoma (GWAS) encontraram significativa associação para SNPs e doença renal crônica (CKD) em vários locus, dentre eles o SPATA5L1. O acometimento renal é a principal causa de morbimortalidade no lúpus e está presente em cerca de 60% dos pacientes. Sabendo-se que a doença renal é importante fator de morbimortalidade no lúpus e que o LESJ está associado a maior gravidade de doença, sendo um dos motivos o acometimento renal, realizaremos este estudo para avaliar a associação da mutação do tipo missense (G>C) (Ser273Cys) no exon 1 do gene SPATA5L1 com doença renal em pacientes lúpicos pediátricos e adultos.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a frequência da mutação missense Ser273Cys no exon 1 do gene SPATSL1 e correlacionar com o quadro clínico em pacientes adultos e pediátricos portadores de LES.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO

**Bairro:** MONTE ALEGRE

**CEP:** 14.048-900

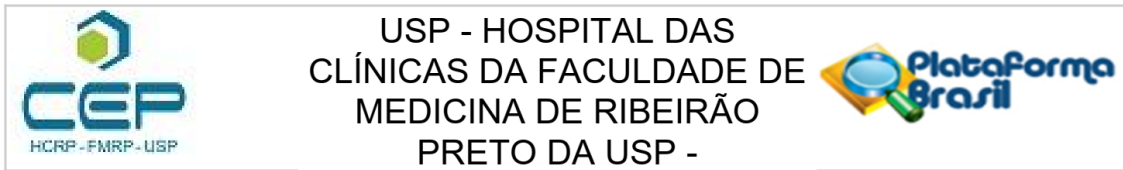
**UF:** SP

**Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3602-2228

**Fax:** (16)3633-1144

**E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 3.458.351

Efeitos deletérios relacionados à venoclise: flebite, dor, edema local na coleta de sangue de pacientes para avaliação de índice de atividade. Efeitos mínimos relacionados à exposição dos dados dos pacientes.

Benefícios:

Produção de material para novas descobertas na etiopatogenia da doença e consequente desenvolvimento de terapias melhores e mais efetivas contra o lúpus.

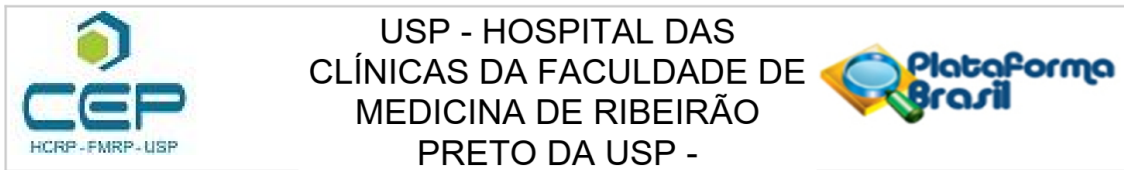
**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto bem fundamentado e com metodologia adequada.

Metodologia Proposta:

Em projeto de pesquisa anterior intitulado: "comparação do perfil genômico de pacientes brasileiros com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e adulto", aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HCFMRP, número do parecer 1.348.987 e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido foi colhido material para avaliação do perfil genético de pacientes pediátricos em acompanhamento na reumatologia pediátrica desse hospital. Utilizando esse material, avaliaremos a mutação do gene SPATA5L1 e suas associações. Nesse estudo já temos 30 pacientes pediátricos e 50 pacientes adultos com DNA extraído para serem analisados. Caso hajam novos candidatos pediátricos esses serão também convidados para participar seguindo o mesmo protocolo. Após avaliação do gene, se mutações deletérias forem encontradas, será avaliada a mutação da proteína SPATA5L1 em biópsias pré realizadas nesses pacientes, através de imunohistoquímica. A avaliação da expressão proteica será realizada no laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC/FMRP-USP). Os pacientes participantes serão, submetidos à avaliação clínica, na qual os dados necessários ao estudo serão obtidos em um questionário específico. A gravidade da doença será mensurada pelo SLEDAI (índice de atividade do LES) e as alterações crônicas serão determinadas pelo índice de dano cumulativo SLLIC/ACR (Lupus International Collaboration Clinics/American College of Rheumatology) no momento da realização da biópsia e momento atual. A gravidade renal será avaliada pela classificação de doença renal crônica baseada na taxa de filtração glomerular e na relação albumina/creatinina, segundo a tabela 1. Devem ser coletadas cerca de 10 ml de sangue, sendo 5 ml em tubo anticoagulante EDTA e 5 ml em tubo seco, que será encaminhada para o Laboratório de Imunologia Pediátrica e o HCRP e após, o DNA extraído para o Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE) para realização dos ensaios laboratoriais, nos casos de pacientes novos. Blocos de parafinas contendo

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO  
**Bairro:** MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 3.458.351

material de biópsia renal previamente realizadas para diagnósticos dos pacientes participantes serão preparadas para a realização do estudo de imunohistoquímica.

**Critério de Inclusão:**

Pacientes em acompanhamento no ambulatório de reumatologia pediátrica e reumatologia clínica que preenchem os critérios classificatórios do ACR para Lúpus Eritematoso Sistêmico.

**Critério de Exclusão:**

Pacientes em acompanhamento no ambulatório de reumatologia pediátrica e reumatologia clínica que não preenchem os critérios classificatórios do ACR para Lúpus Eritematoso Sistêmico.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A pesquisadora respondeu as pendências:

- explicacao\_modelo\_TCLE.docx
- TERMO\_DE\_CONSENTIMENTO\_LIVRE\_E\_ESCLARECIDO\_ADULTO010719.docx
- TERMO\_DE\_CONSENTIMENTO\_LIVRE\_E\_ESCLARECIDO\_ADULTO\_NOVOS\_PACIENTES.docx
- Termo\_de\_Consentimento\_e\_Assentimento010719.docx
- Termo\_de\_Consentimento\_e\_Assentimento\_Versao\_Novos\_Pacientes.docx

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa e o Biorrepositório, assim como o TERMO\_DE\_CONSENTIMENTO\_LIVRE\_E\_ESCLARECIDO\_ADULTO010719, TERMO\_DE\_CONSENTIMENTO\_LIVRE\_E\_ESCLARECIDO\_ADULTO\_NOVOS\_PACIENTES, Termo\_de\_Consentimento\_e\_Assentimento010719, Termo\_de\_Consentimento\_e\_Assentimento\_Versao\_Novos\_Pacientes, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

<b>Endereço:</b> CAMPUS UNIVERSITÁRIO	
<b>Bairro:</b> MONTE ALEGRE	<b>CEP:</b> 14.048-900
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> RIBEIRAO PRETO
<b>Telefone:</b> (16)3602-2228	<b>Fax:</b> (16)3633-1144
	<b>E-mail:</b> cep@hcrp.usp.br





**USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -**



Continuação do Parecer: 3.458.351

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1272313.pdf	01/07/2019 16:35:46		Aceito
Outros	explicacao_modelo_TCLE.docx	01/07/2019 16:35:28	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO_ADULTO010719.docx	01/07/2019 16:34:56	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_LIVRE_E_ESCLARECIDO_ADULTO_NOVOS_PACIENTES.docx	01/07/2019 16:34:45	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_e_Assentimento010719.docx	01/07/2019 16:34:30	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Consentimento_e_Assentimento_Versao_Novos_Pacientes.docx	01/07/2019 16:34:18	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOPAOLAKAHWAGE300619.docx	30/06/2019 22:01:08	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
Outros	CartaResposta.docx	27/06/2019 17:27:27	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AceiteDepartamentoPatologia.pdf	27/06/2019 17:25:14	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	SolicitacaoBiorrepositorioVerso.pdf	27/06/2019 17:24:54	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	SolicitacaoBiorrepositorioFrente.pdf	27/06/2019 17:18:50	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
Outros	Parecer_UPC.pdf	28/05/2019 08:51:28	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Parecer_FMRP_Departamento_de_Puericultura.pdf	28/05/2019 08:50:12	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	PROJETOPAOLAKAHWAGE.docx	27/05/2019 22:44:03	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO

**Bairro:** MONTE ALEGRE

**CEP:** 14.048-900

**UF:** SP

**Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3602-2228

**Fax:** (16)3633-1144

**E-mail:** cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DE RIBEIRÃO  
PRETO DA USP -



Continuação do Parecer: 3.458.351

Investigador	PROJETOPAOLAKAHWAGE.docx	27/05/2019 22:44:03	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Assentimento_Pais_e_Termo_de_Assentimento.docx	02/05/2019 17:26:09	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Assentimento_Adulto.docx	02/05/2019 17:25:24	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
Orçamento	Orcamento_Projeto_Paola.docx	12/03/2019 20:08:35	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia.pdf	12/03/2019 20:08:15	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
Cronograma	CronogramaPaolaKahwage.docx	12/03/2019 19:49:10	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoPaolaKahwage.pdf	12/03/2019 19:37:03	PAOLA PINHEIRO KAHWAGE	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RIBEIRAO PRETO, 17 de Julho de 2019

---

**Assinado por:**  
**MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** CAMPUS UNIVERSITÁRIO

**Bairro:** MONTE ALEGRE

**CEP:** 14.048-900

**UF:** SP

**Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3602-2228

**Fax:** (16)3633-1144

**E-mail:** cep@hcrp.usp.br

### **ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - ASSENTIMENTO**

Pesquisadores: Paola Pinheiro Kahwage  
Luciana Martins de Carvalho: Médica  
Virgínia Paes Leme Ferriani: Médica

#### **Informações ao paciente**

**Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, ela se chama: “Associação de mutação do tipo missense no gene SPATA5L1 e gravidade de nefrite lúpica em crianças e adultos”**

O lúpus é uma doença que causa inflamação em vários órgãos do corpo, como o rim, devido ao descontrole na formação dos anticorpos, isto é, das células de nossa defesa. Ainda não sabemos o que realmente causa o lúpus. Parece ter uma causa genética (transmitida pela família), junto a outros fatores, como infecção e problemas emocionais, mas isso ainda precisa ser estudado.

#### Por que este estudo está sendo feito?

Existe um gene chamado “SPATA5L1” que gostaríamos de estudar no lúpus, pois parece estar envolvido em problemas do rim, como acontece no lúpus.

#### Como será feito o estudo?

Se você concordar em participar do estudo, usaremos o material armazenado de coleta de material renal que você já realizou. Pegaremos algumas informações de seu prontuário médico para avaliar a atividade de sua doença.

#### Existem riscos para participar do estudo?

Existem poucos riscos, apenas de algumas informações presentes no seu prontuário médico serem conhecidas por outras pessoas. Mas faremos tudo para que isso não aconteça.

#### Quais são os benefícios do estudo?

Se tudo der certo, poderemos descobrir novas causas para o aparecimento do lúpus e assim ajudar outras pessoas com essa doença.

Quem terá acesso aos dados da pesquisa?

Só terão acesso à essas informações, os seus médicos do HC e os pesquisadores desse estudo.

Quais serão as recompensas para a participação?

Você não terá nenhuma recompensa.

É obrigatória a minha participação?

Não. Se você decidir agora ou mais tarde que não quer participar do estudo, poderá desistir a qualquer momento, sem que isso atrapalhe no seu tratamento.

Com quem devo falar se houver algum problema?

Se houver alguma queixa **relacionada ao estudo**, você deve falar com a médica Dra. Paola (e-mail. [paola\\_pinheiro@hotmail.com](mailto:paola_pinheiro@hotmail.com); telefone 16- 36026635), ou se tiver queixa ou opinião sobre o estudo poderá ir ao Comitê de Ética em Pesquisa com endereço abaixo:

CEP: ☒ Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, Campus Universitário; telefone (16) 3602 2228, Fax: (16) 3633 1144 e e-mail: [cep@hcrp.fmrp.usp.br](mailto:cep@hcrp.fmrp.usp.br)

- 1- Você foi convidado a fazer parte deste estudo. A pessoa encarregada do estudo vai explicar o projeto e após você poderá decidir se quer ou não participar.
- 2- Por favor, faça todas as perguntas que quiser, antes de decidir se você irá participar do estudo.
- 3- Se você decidir que irá participar agora, mas depois decidir que você não quer mais participar, apenas diga ao responsável e isto não prejudicará de nenhuma forma o seu tratamento
- 4- Você receberá a folha de informações sobre a pesquisa para ler, guardar para se precisar ler novamente as informações em qualquer momento.
- 5- Em qualquer momento que houver queixas sobre a participação de seu filho (a) neste projeto, comunique-se com o responsável.

Você.....

Após receber informações necessárias, concorda em participar do Projeto de Pesquisa **“Associação de mutação do tipo missense no gene SPATA5L1 e gravidade de nefrite lúpica em crianças e adultos”**. Afirmo que leu e entendeu as explicações sobre a pesquisa.

Assinatura do Paciente.....

Data.....

Assinatura do Pesquisador.....

Data.....

## ANEXO 4 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisadores: Paola Pinheiro Kahwage

Luciana Martins de Carvalho: Médica

Virgínia Paes Leme Ferriani: Médica

### Informações aos pais

Seu filho (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa, ela se chama: “Associação de mutação do tipo missense no gene SPATA5L1 e gravidade de nefrite lúpica em crianças e adultos”

O lúpus é uma doença que causa inflamação em vários órgãos do corpo, como o rim, devido ao descontrole na formação dos anticorpos, isto é, das células de nossa defesa. Ainda não sabemos o que realmente causa o lúpus. Parece ter uma causa genética (transmitida pela família), junto a outros fatores, como infecção e problemas emocionais, mas isso ainda precisa ser estudado.

### Por que este estudo está sendo feito?

Existe um gene chamado “SPATA5L1” que gostaríamos de estudar no lúpus, pois parece estar envolvido em problemas do rim, como acontece no lúpus.

### Como será feito o estudo?

**Se vocês concordarem em participar do estudo, usaremos o material armazenado de coleta de material renal que seu filho (a) já realizou. Pegaremos algumas informações de seu prontuário médico para avaliar o quanto estava forte ou fraco a doença de seu filho.**

Existem riscos para participar do estudo?

Existem poucos riscos, apenas de algumas informações presentes no prontuário médico de seu filho (a) serem conhecidas por outras pessoas. Mas faremos tudo para que isso não aconteça.

Quais são os benefícios do estudo?

Se tudo der certo, poderemos descobrir novas causas para o aparecimento do lúpus e assim ajudar outras pessoas com essa doença.

Quem terá acesso aos dados da pesquisa?

Só terão acesso à essas informações, os médicos do seu filho(a) que trabalha no HC e os pesquisadores desse estudo.

Quais serão as recompensas para a participação?

**Seu filho (a) não terá nenhuma recompensa.**

É obrigatória a minha participação?

Não. Se vocês decidirem agora ou mais tarde que não querem participar do estudo, poderão desistir a qualquer momento sem que isso atrapalhe no tratamento do seu filho(a).

Com quem devo falar se houver algum problema?

**Se houver alguma queixa relacionada ao estudo, você deve falar com a médica Dra. Paola (e-mail. [paola\\_pinheiro@hotmail.com](mailto:paola_pinheiro@hotmail.com); telefone 16- 36026635), ou se tiver queixa ou opinião sobre o estudo poderá ir ao Comitê de Ética em Pesquisa. Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que estão sendo feitas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto está localizado no Subsolo do Hospital e funciona das 8:00 às 17:00. O telefone de contato é o (16) 3602-2228.**

1. Você foi convidado a fazer parte desta pesquisa. A pessoa encarregada do estudo vai explicar o projeto e após você poderá decidir se quer ou não participar.
2. Por favor, faça todas as perguntas que quiser, antes de decidir se seu filho (a) irá participar da pesquisa.
3. Se você decidir que seu filho (a) irá participar agora, mas depois decidir que você não quer mais participar, apenas diga ao responsável e isto não prejudicará de nenhuma forma o tratamento de seu filho (a).
4. Você receberá a folha de informações sobre a pesquisa para ler, guardar para se precisar ler novamente as informações em qualquer momento. Em qualquer momento que houver queixas sobre a participação de seu filho (a) neste projeto, comunique-se com o responsável.

Você.....,

pai, mãe ou responsável por.....

Após receber informações necessárias, concorda em participar do Projeto de Pesquisa “Avaliação de Aterosclerose Subclínica em Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil”, após receber as explicações necessárias.

Afirma que leu e entendeu as explicações sobre a pesquisa.

Assinatura dos pais ou responsáveis .....

Data:.....

Assinatura do paciente: .....

Data:.....

**Assinatura do pesquisador: .....**

**Data: .....**



**ANEXO 5- ÍNDICE DE ATIVIDADE DA DOENÇA DO LÚPUS ERITEMATOSO  
SISTÊMICO 2000 (SLEDAI-2K) (HOCHBERG, 1997).**

<b>MANIFESTAÇÃO</b>	<b>DEFINIÇÃO</b>	<b>PESO</b>
<b>CONVULSÃO</b>	EXCLUIR CAUSAS METABÓLICAS, INFECCIOSAS OU DROGAS.	<b>8</b>
<b>PSICOSE</b>	ALTERAÇÃO DA PERCEPÇÃO DA REALIDADE, INCLUINDO-SE ALUCINAÇÕES, INCOERÊNCIAS, PENSAMENTO DESORGANIZADO, CATATONIA. EXCLUIR DROGAS E UREMIA.	<b>8</b>
<b>SÍNDROME ORGÂNICO-CEREBRAL</b>	ALTERAÇÃO MENTAL COM DÉFICIT DE ORIENTAÇÃO, MEMÓRIA, JULGAMENTO E ATENÇÃO, COM DOIS DE: FALA INCOERENTE, INSÔNIA, SONOLÊNCIA, HIPO/HIPERATIVIDADE MOTORA. EXCLUIR CAUSAS METABÓLICAS, INFECCIOSAS OU DROGAS.	<b>8</b>
<b>ALTERAÇÕES VISUAIS</b>	CORPOS CETÓIDES OU HEMORRAGIAS RETINIANAS, EXSUDATOS OU HEMORRAGIAS DE CORÓIDE, NEURITE ÓPTICA. EXCLUIR CAUSAS INFECCIOSAS, DROGAS OU HIPERTENSÃO.	<b>8</b>
<b>ALTERAÇÕES DE NERVOS CRANIANOS</b>	NEUROPATIA MOTORA OU SENSORIAL.	<b>8</b>
<b>CEFALÉIA</b>	PERSISTENTE, INTENSA, TIPO ENXAQUECA, NÃO RESPONSIVA AOS ANALGÉSICOS NARCÓTICOS.	<b>8</b>
<b>ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL</b>	EXCLUIR ATEROSCLEROSE.	<b>8</b>
<b>VASCULITES</b>	ÚLCERAS, GANGRENA, NÓDULOS DOLOROSOS, INFARTO SUB OU PERIUNGUEAL, BIÓPSIA OU ANGIOGRAFIA COMPATÍVEL.	<b>8</b>
<b>ARTRITES</b>	DUAS OU MAIS ARTICULAÇÕES.	<b>4</b>
<b>MIOSITES</b>	FRAQUEZA OU DOR MUSCULAR PROXIMAL COM: ELEVAÇÃO DE ENZIMAS MUSCULARES, ELETROMIOGRAFIA OU BIÓPSIA COMPATÍVEIS.	<b>4</b>
<b>CILINDROS URINÁRIOS</b>	GRANULOSOS OU HEMÁTICOS.	<b>4</b>
<b>HEMATÚRIA</b>	MAIOR QUE 5 HEMÁCIAS POR CAMPO. EXCLUIR CÁLCULOS OU INFECCÕES.	<b>4</b>
<b>PROTEINÚRIA</b>	MAIOR QUE 0,5G/DIA DE INÍCIO RECENTE OU AUMENTO MAIOR QUE 0,5G/DIA EM RELAÇÃO AOS VALORES ANTERIORES.	<b>4</b>
<b>LEUCOCITÚRIA</b>	MAIOR QUE 5 LEUCÓCITOS POR CAMPO. EXCLUIR INFECCÕES.	<b>4</b>
<b>ERITEMA MALAR</b>	ERITEMA SOBRE AS EMINÊNCIAS MALARES POUPIANDO OS SULCOS NASOLABIAIS	<b>2</b>
<b>ALOPÉCIA</b>	PERDA ANORMAL DE CABELOS, DE FORMA LOCALIZADA OU DIFUSA.	<b>2</b>
<b>ÚLCERAS DE MUCOSAS</b>	ÚLCERAS ORAIS OU NAAIS.	<b>2</b>

<b>PLEURITE</b>	<b>DOR PLEURÍTICA, COM ATRITO OU DERRAME PLEURAL, OU ESPESSAMENTO PLEURAL.</b>	<b>2</b>
<b>PERICARDITE</b>	<b>DOR PERICÁRDICA COM ATRITO, DERRAME OU ELETROCARDIOGRAMA OU ECOCARDIOGRAMA COMPATÍVEIS.</b>	<b>2</b>
<b>DIMINUIÇÃO DE COMPLEMENTO</b>	<b>DE DIMINUIÇÃO DE C3, C4 OU CH50.</b>	<b>2</b>
<b>ANTI-DNA</b>	<b>PRESENÇA.</b>	<b>2</b>
<b>FEBRE</b>	<b>TEMPERATURA MAIOR QUE 38°C. EXCLUIR INFECÇÕES.</b>	<b>1</b>
<b>PLAQUETOPENIA</b>	<b>MENOR QUE 100.000 PLAQUETAS POR MM<sup>3</sup>.</b>	<b>1</b>
<b>LEUCOPENIA</b>	<b>MENOR QUE 3.000 LEUCÓCITOS POR MM<sup>3</sup>. EXCLUIR DROGAS.</b>	<b>1</b>
<b>TOTAL</b>		

Obs: válido para manifestações de início recente (até dez dias anteriores à avaliação).

**ANEXO 6 -SISTEMA DE PONTUAÇÃO PARA O ÍNDICE BILAG - VERSÃO 3**  
**(ADAPTADO DE HAY *ET AL.*, 1993)**

---

<b>Categoria A</b>	Doença ativa que exige uso de droga modificadora de doença (imunossupressor ou prednisolona > 20mg/d).
<b>Categoria B</b>	Doença menos ativa que em “A”: problemas reversíveis que exigem apenas terapia sintomática como antimaláricos, anti-inflamatório não hormonal ou prednisolona < 20mg/d.
<b>Categoria C</b>	Doença leve estável
<b>Categoria D</b>	Sistema anteriormente afetado, porém atualmente inativo
<b>Categoria E</b>	Sistema nunca acometido

---

**ANEXO 7 -SYSTEMIC LUPUS INTERNATIONAL COLLABORATING  
CLINICS/ACR-DAMAGE INDEX (SLICC/ACR-DI) (GLADMAN *ET AL.*, 1996)**

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_ Tempo de seguimento\_\_\_\_\_

---

**Ocular** (qualquer olho, por avaliação clínica)

- 1 ( ) Catarata em qualquer época  
1 ( ) Alteração retiniana ou atrofia óptica

---

**Neuropsiquiátrico**

- 1 ( ) Prejuízo cognitivo (p. ex. deficiência de memória, dificuldade com cálculo, dificuldade de concentração, dificuldade com linguagem escrita ou falada, prejuízo no nível de execução) ou Psicose  
1 ( ) Convulsões requerendo tratamento por 6 meses  
1 ( ) 2 ( ) AVC em qualquer época (pontuar 2 se >1)  
1 ( ) Neuropatia craniana ou periférica (excluir óptica)  
1 ( ) Mielite transversa

---

**Renal**

- 1 ( ) Taxa de filtração glomerular medida ou estimada < 50%  
1 ( ) Proteinúria 3,5 g/24h  
ou  
3 ( ) Insuficiência renal terminal (a despeito de diálise ou transplante)

---

**Pulmonar**

- 1 ( ) Hipertensão pulmonar (aumento de VD ou hiperfonese de B2)  
1 ( ) Fibrose pulmonar (ex. físico e radiográfico)  
1 ( ) Pulmão retraído (radiográfico)  
1 ( ) Fibrose pleural (radiográfico)  
1 ( ) Infarto pulmonar (radiográfico)

---

**Cardiovascular**

- 1 ( )            Angina ou ponte coronariana
  - 1 ( ) 2 ( )      IAM em qualquer época (pontuar 2 se >1)
  - 1 ( )            Miocardiopatia (disfunção ventricular)
  - 1 ( )            Doença valvular (sopro diastólico ou sistólico > 3+/6+)
  - 1 ( )            Pericardite por 6 meses ou pericardectomia
- 

**Vascular periférico**

- 1 ( )            Claudicação por 6 meses
  - 1 ( )            Perda tecidual menor (polpa digital)
  - 1 ( ) 2 ( )      Perda tecidual significativa em qualquer época (p. ex. dedo ou membro) (pontuar 2 se > 1 local)
  - 1 ( )            Trombose venosa com edema, ulceração ou estase venosa
- 

**Gastrintestinal**

- 1 ( ) 2 ( )      Infarto ou ressecção de intestino (abaixo do duodeno), baço, fígado ou vesícula, em qualquer época e por qualquer causa (pontuar 2 se >1 local)
  - 1 ( )            Insuficiência mesentérica
  - 1 ( )            Peritonite crônica
  - 1 ( )            Estenose ou cirurgia em TGI superior em qualquer época
- 

**Musculoesquelético**

- 1 ( )            Atrofia muscular ou fraqueza
  - 1 ( )            Artrite erosiva ou deformante (inclui formas redutíveis e exclui necrose avascular)
  - 1 ( )            Osteoporose com fratura ou colapso vertebral (exclui necrose avascular)
  - 1 ( ) 2 ( )      Necrose avascular (pontuar 2 se >1)
  - 1 ( )            Osteomielite
- 

**Pele**

- 1 ( ) Alopecia crônica cicatricial
- 1 ( ) Cicatriz cutânea ou panicular extensa que não em polpa ou couro cabeludo
- 1 ( ) Úlcera cutânea (excluindo trombose) por > 6 meses

---

**Outros**

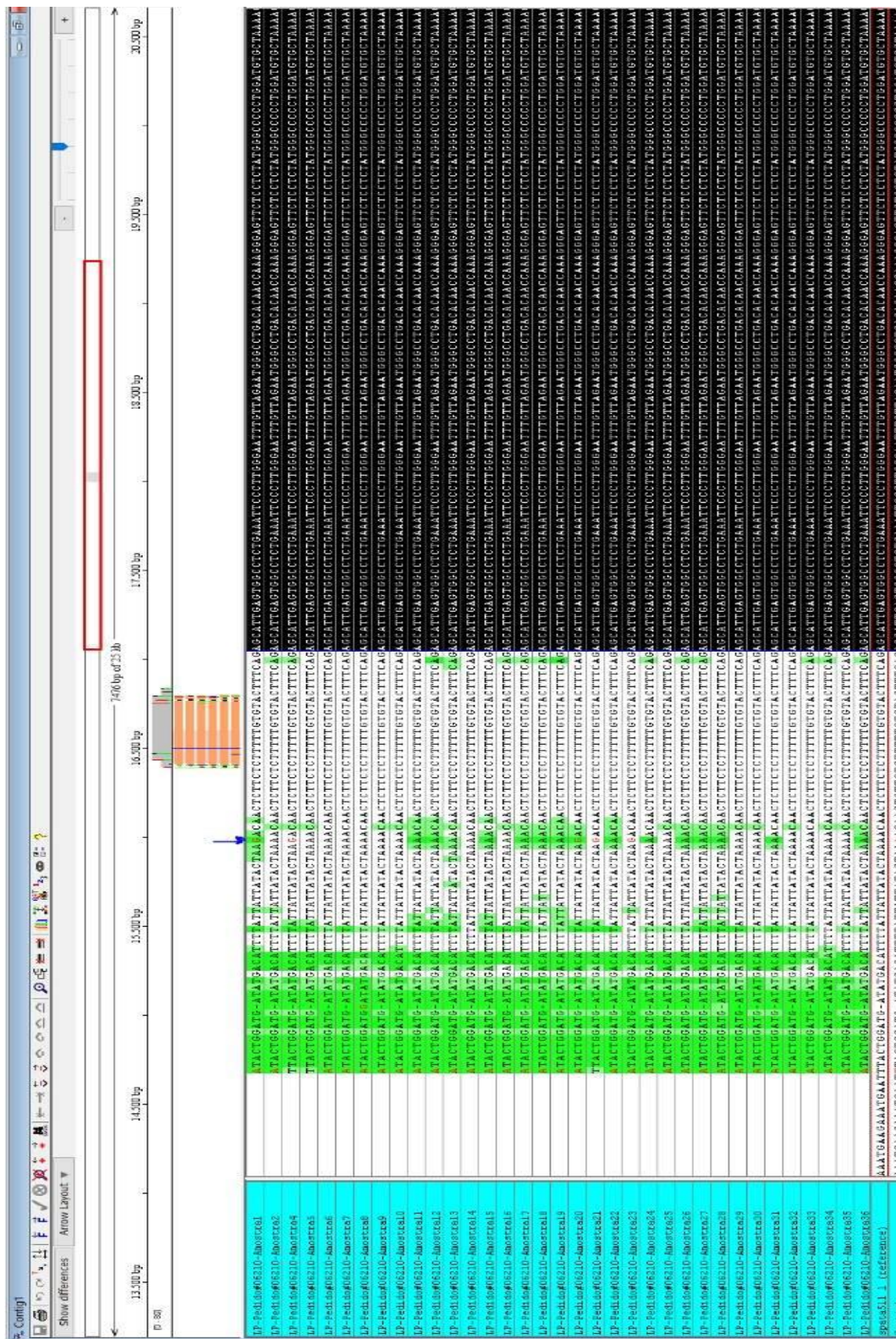
- 1 ( ) Falência gonadal prematura
- 1 ( ) Diabetes (a despeito de tratamento)
- 1 ( ) 2 ( ) Malignidade (exclui displasia) (pontuar 2 se >1 local)

Total: \_\_\_\_\_

Dano (mudança irreversível, não relacionada com inflamação ativa) ocorrendo desde o início do Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil, certificada por avaliação clínica e presente por pelo menos seis meses, a menos que ressalvado de outra forma. Episódios repetidos devem ocorrer com intervalos mínimo de seis meses para pontuarem. A mesma lesão não pode ser pontuada duas vezes.

## ANEXO 8 – IMAGEM REPRESENTATIVA DO SEQUENCIAMENTO DO GENE

### SPATA5L1



Em preto: localização dos exons.  
Na seta azul: localização dos polimorfismos intrônicos

**ANEXO 9 – PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS PARCIAIS DA TESE DE  
DOUTORADO NOS ANAIS DO CONGRESSO EUROPEU DE REUMATOLOGIA  
PEDIÁTRICA - 2022**

**P292.****High expression of spata511 protein in lupus nephritis**

P. P. Kahwage<sup>1</sup>, R. R. Moura<sup>2</sup>, G. R. Sousa<sup>1</sup>, K. B. Salomão<sup>1</sup>, F. P. Saggioro<sup>3</sup>, I. Facincani<sup>1</sup>, D. Q. Nascimento<sup>4</sup>, R. S. Costa<sup>1</sup>, R. G. P. Queiroz<sup>1</sup>, E. T. Valera<sup>1</sup>, L. Rodrigues<sup>1</sup>, V. P. L. Ferriani<sup>1</sup>, S. Crovella<sup>5</sup>, P. Sandrin-Garcia<sup>4</sup>, L. M. de Carvalho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, <sup>2</sup>Advanced Diagnostics, Institute for Maternal and Child Health-IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste, Italy, <sup>3</sup>Pathology, Rede D'Or, São Paulo, <sup>4</sup>Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil, <sup>5</sup>Biological and Environmental Sciences, College of Arts and Sciences, Qatar University, Doha, Qatar

**Correspondence:** L. M. de Carvalho

*Pediatric Rheumatology* 2022, **20(Suppl 2)**:P292.

**Introduction:** Systemic lupus erythematosus is a complex autoimmune disease with genetic and immunological factors involved in its triggering. The Spermatogenesis-associated protein 5-like protein 1 - SPATA5L1 is ubiquitously expressed in kidneys and other tissues and previously had been associated with indices of renal function and chronic kidney disease (CKD)<sup>(1)</sup>. In a previous study we reported a *SPATA5L1* gene pathogenic variant associated with a high expression of the protein in full-house nephropathy<sup>(2)</sup>.

**Objectives:** The aim of this study was to explore the expression of this protein in renal biopsies of lupus nephritis and normal kidney controls.

**Methods:** This cross-sectional study was performed with 29 childhood-onset systemic lupus erythematosus patients – cSLE, followed in the Pediatric Rheumatology Clinic of the Clinical Hospital of Ribeirão Preto Medical School – São Paulo University, Brazil. All cSLE patients fulfilled the American College of Rheumatology classification criteria for SLE, onset of the disease occurred under 18 years and recruited up to 21 years of age. As controls, four healthy kidneys were obtained from patients submitted to an autopsy from our Pathology and Forensic Medicine Service. Sanger sequencing analysis was performed in the cSLE patients to identify a previously reported pathogenic variant (rs143453038) associated with high protein expression in full-house nephropathy. The evaluation of SPATA5L1 protein expression was performed in biopsy samples by immunohistochemistry of all patients and controls. This study was approved by the Research Ethics Committee.

**Results:** The sequencing analysis did not find the *SPATA5L1* gene variant previously reported (rs143453038) in cSLE patients. However, we observed strong positive immunostaining for SPATA5L1 in nephritis lupus renal biopsies (class IV and V), while no or weak SPATA5L1 immunostaining was observed in non-inflammatory renal tissues.

**Conclusion:** The expression of SPATA5L1 protein is higher in lupus nephritis biopsies as compared to health kidneys. Our results suggested that the SPATA5L1 protein may be involved in lupus pathogenesis or may function as a renal biomarker of inflammatory activity in these patients. More studies are needed to clarify the role of SPATA5L1 protein in cSLE.

**References:** 1.Köttgen A, Glazer NL, Dehghan A, Hwang SJ, Katz R, Li M, et al. Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. *Nat Genet.* 2009;41(6):712-7. 2.de Carvalho LM, de Sousa GR, Moura R, Saggioro F, Facincani I, Costa R, et al. Full-house nephropathy associated with high expression of SPATA5L1 due to a genetic pathogenic variant. *Rheumatology (Oxford).* 2022;61(4):e84-e6.

Patient Consent: Yes, I received consent

**Disclosure of Interest:** None declared