

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO GENE *MBL2* COM INFECÇÕES GRAVES
EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO: ESTUDO DE 10 ANOS**

CARLA FORGIARINI SALDANHA

Orientador: Prof. Dr. Odirlei André Monticielo

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Saldanha, Carla Forgiarini

Associação de polimorfismos do gene MBL2 com infecções graves em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico: estudo de 10 anos / Carla Forgiarini Saldanha. -- 2017.

48 f.

Orientador: Odirlei André Monticielo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Lúpus eritematoso sistêmico. 2. Lectina ligadora de manose. 3. Infecções. 4. Hospitalizações. 5. Genética e imunologia. I. Monticielo, Odirlei André, orient. II. Título.

BANCA EXAMINADORA

Rafael Mendonça da Silva Chakr

Ricardo Machado Xavier

Maria Lucia Lemos Lopes

Charles Lubianca Kohem

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao “Dono do tempo” por sempre ser generoso e fazer com que meu caminho seja repleto de encontros felizes com pessoas e momentos que me ajudam a crescer em todos os sentidos. Também por me ensinar que as prioridades não precisam mudar como muitos falam, mas por vezes a estratégia de alcançá-las sim.

A minha família pelo amor e apoio incondicionais. Aos meus pais que são meus exemplos de vida, obrigada por sempre fazerem o melhor em tudo e por todos e por terem passado valores inestimáveis. Vocês norteiam calorosamente as minhas decisões. Minha irmã por aguentar meu “mimimi” e ter sempre palavras de otimismo e uma risada como forma de carinho. Ao meu marido (“Benzo”) que além de ter participado ativamente nessa reta final do mestrado (por ter descoberto comigo que nem sempre a nuvem é confiável) sempre me apoia, divide o pouco tempo que temos juntos (com a generosidade que só o amor explica) para que eu possa ir atrás dos meus objetivos, torce e vibra a cada pequena conquista mesmo sem entender o porquê de eu gostar tanto disso tudo. Meus “filhos” caninos por me lembrarem que mesmo diante do caos sempre há uma brecha para brincar e distribuir amor deixando tudo mais leve.

Aos meus professores pela paciência. Ressalto alguns: Dr Mauro Pontes por ter me aberto o mundo da pesquisa clínica e ensinado a ama-la e respeita-la. Dr Danzmann e Dr Ilmar Kohler por mostrarem que é recompensador ser fiel ao que acreditamos e persistir mesmo que o caminho não seja o mais favorável a exemplo de fazer pesquisa no Brasil. Aos queridos preceptores Dra Maria Lúcia Lemos, Dr Waldir Castro e Dr Charles Kohem que me ajudaram a olhar para o lado durante a medicina interna e me encantar com a Reumatologia. Ao meu orientador, Dr Odirlei Monticielo, não apenas pelas oportunidades, muita paciência e incentivo, mas acima de tudo pelo exemplo de profissional e pessoa que foram decisivos para escolher minha área de estudo e moldar a forma como exerço minha vocação.

A todo o time do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por me acolherem e me mostrarem como se faz! Minha eterna admiração e carinho a vocês. Frequentemente me pergunto em que degrau estou hoje...

E finalmente, as pessoas que chegam a mim como pacientes e que são o combustível para minha curiosidade e energia de descobrir mais e fazer malabarismos com o tempo.

Com coração agradeço a todos!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença multifatorial em que variantes genéticas como do gene *MBL2* podem contribuir para sua etiopatogenia e aumento de risco de infecção nesta população.

Objetivo: Avaliar a relação entre polimorfismos do gene *MBL2* e seus haplótipos da região codificante e promotora e internação, número de internações e total de dias internados para tratamento de infecções graves em pacientes com LES do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Métodos: Trezentos e vinte e cinco pacientes consecutivos com LES do Hospital de Clínicas de Porto Alegre realizaram análise genética para polimorfismos da região codificante e promotora do gene *MBL2* em 2006 sendo acompanhados até 2016. Informações clínicas e laboratoriais foram obtidas além de dados sobre internações, número de internações e total de dias de internação para tratamento de infecções por revisão de prontuários que foram relacionados com polimorfismos do gene *MBL2* e seus haplótipos. O modelo de regressão linear foi construído considerando as variáveis que na análise bivariada demonstraram associação significativa com número de internações e total de dias internados além de variáveis com embasamento teórico. Valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo em todas as análises.

Resultados: Não houve diferença significativa entre a prevalência dos polimorfismos avaliados entre os grupos de pacientes que internaram e os que não internaram para tratamento de infecções graves. Pacientes com alelo C e os haplótipos LY e HY tiveram maior número de internações por infecção grave: homocigoto normal para C: 2 [intervalo interquartil (IIQ) 1-3] e heterocigoto para C: 3 (IIQ 2-6), $p=0,038$; LY: 2 (IIQ 1-3), $p=0,048$; HY: 2 (IIQ 1-3), $p=0,005$. Além disso, os pacientes com HY tiveram menor tempo de internação hospitalar: 18 (IQR 10-38) $p=0,041$. Após modelo de análise multivariada, a presença de HY permaneceu com menor tempo de internação independente das outras variáveis (-18,11 dias, $p=0,021$) e pacientes com HY e idade mais avançada no diagnóstico do LES tiveram menos internações (modelo de regressão linear com HY: -1,52, $p=0,001$; modelo de regressão linear com HY para idade no diagnóstico do LES: -0,42, $p=0,006$; modelo de regressão linear com LY para idade no diagnóstico do LES: 0,04, $p=0,010$; modelo de regressão linear com alelo C para idade no diagnóstico do LES: -0,04, $p=0,013$).

Conclusão: A presença do haplótipo HY localizado na região promotora do gene *MBL2* leva as internações por infecções graves serem mais curtas provavelmente porque este haplótipo também está relacionado aos genótipos do gene *MBL2* que expressam níveis séricos mais altos de MBL. Também a presença do haplótipo HY e idade mais avançada no diagnóstico do LES estão relacionados com menos internações por infecções graves. Esses achados são importantes considerando que infecção é uma causa ainda frequente de morte em pacientes com LES e que não está apenas relacionada com tratamento imunossupressor.

Palavras chave: Lúpus eritematoso sistêmico, lectina ligadora de manose, infecções, internações, genética e imunologia

ABSTRACT

Introduction: Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multifactorial disease and genetics variants like *MBL2* gene was pointed to influence its etiology and increase infection risk in this population.

Objective: To evaluate the relation of *MBL2* gene polymorphisms and haplotypes of coding and promoter region with hospitalization, number of admission and days of admission for major infection causes in Brazilian SLE patients.

Methods: Three hundred and twenty-five consecutive SLE patients from a southern Brazilian outpatient SLE clinic in Hospital de Clínicas de Porto Alegre were genotyped in 2006 for *MBL2* gene polymorphisms from coding and promoter region and followed until 2016. Clinical and laboratory data from each patient was obtained and information regarding the need for hospitalization, the number of admissions and amount of days admitted for infection treatment registered by chart review which were then related with *MBL2* gene polymorphisms and haplotypes. A linear regression analysis was constructed considering the variables of bivariate analyses associated with number of admissions and total days admitted for major infection treatment besides variables which had a theoretical basement. P-value <0.05 was considered significant in all analyzes.

Results: No difference was found in polymorphism prevalence when comparing the group that was admitted for infection treatment from the group who did not. Allele C, haplotype LY e HY patients showed more infection hospitalizations (normal homozygosis for C: 2 [interquartile range (IQR) 1-3], heterozygosis for C: 3 (IQR 2-6), p=0.038; LY: 2 (IQR 1-3), p=0.049; HY: 2 (IQR 1-3), p=0.005) and haplotype HY staid fewer days in hospital for infection treatment: 18 (IQR 10-38), p=0.041. When applied linear regression HY was independently associated with shorter admissions for infections (-18.11 days, p=0.021) and HY with older age at SLE diagnosis had less admissions for infection (HY regression model: -1.52 admissions, p=0.001; HY regression model for age at diagnosis: -0.42, p=0.006; LY regression model for age at diagnosis: -0.04, p=0.010; allele C regression model for age at diagnosis: -0.04, p=0.013).

Conclusion: Presence of HY promoter haplotype of *MBL2* gene leads to shorter hospitalizations care for infection treatment probably because HY promoter haplotype is also related to higher MBL plasma expression genotypes. Also, HY haplotype and older age at SLE diagnosis are

related to less admissions for major infection. This is important considering that infection still a frequent cause of mortality in SLE patients and not only related to immunosuppressive treatment.

Key Words: Systemic lupus erythematosus, mannose-binding lectin, infections, hospitalization, genetics and immunology

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1: Fluxograma da estratégia de busca para localizar e selecionar as informações da pesquisa.....	17
--	----

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1: HY promoter haplotype of <i>MBL2</i> gene and its relation with days admitted for infection treatment.....	40
---	----

LISTA DE TABELAS DA REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1: Resumo dos principais artigos publicados avaliando polimorfismos do gene <i>MBL2</i> e relação com infecção	21
--	----

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Table 1: Baseline features of SLE patients admitted for major infection treatment and patients who did not.	37
Table 2: <i>MBL2</i> gene polymorphisms and haplotypes associated to admission, number of admissions and days admitted for infection treatment.....	38
Table 3: Linear regression model for days admitted for infection and total admissions for infection treatment.	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANA	Antinuclear antibody (anticorpo anti-nuclear)
Anti-dsDNA	Anticorpo anti-DNA dupla hélice
Anti-Sm	Anticorpo anti-Smith
IIQ	Intervalo interquartil
IQR	<i>Interquartile range</i> (Intervalo interquartil)
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
MBL	<i>Mannose-binding lectin</i> (Lectina ligadora da manose)
SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i> (Índice de atividade de doença do Lúpus eritematoso sistêmico)
SLICC	<i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics</i>
SLE	<i>Systemic lupus erythematosus</i> (Lúpus eritematoso sistêmico)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1. Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	17
2.2. Patogênese do lúpus eritematoso sistêmico (LES).....	18
2.3. <i>Mannose-binding lectin</i> (MBL)	18
2.3.1. MBL e LES	20
2.3.2. Polimorfismos do gene <i>MBL2</i> , MBL sérica, LES e infecção	20
3. MARCO TEÓRICO	22
4. JUSTIFICATIVA.....	23
5. OBJETIVOS.....	24
5.1. Objetivo primário	24
5.2. Objetivo secundário.....	24
6. REFERÊNCIAS	25
7. ARTIGO EM INGLÊS.....	28
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	43
10. ANEXOS.....	44
Anexo I. Protocolo de coleta de dados	44
Anexo II. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	46
Anexo III. Termo de confidencialidade para o uso de dados.....	48
Anexo IV. Declaração STROBE.....	49

1. INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença multifatorial, autoimune, crônica caracterizada pela disfunção de células B e T com amplo espectro de manifestações clínicas decorrente da produção de autoanticorpos, ativação do sistema de complemento e deposição de imunocomplexos ¹. O entendimento de sua etiologia e fisiopatogenia é ainda incompleto, embora seja conhecido que a combinação de fatores genéticos, hormonais e ambientais está intrinsecamente envolvida na patogênese dessa doença ².

O sistema imune inato é de grande importância na patogênese do LES, sendo um dos mecanismos envolvidos na ativação anormal do sistema de complemento, tendendo a um grau de auto inflamação e lesão em órgão alvo. Também já foi proposto que um conjunto de polimorfismos genéticos influenciem a fisiopatogênese, características clínicas e, inclusive, a susceptibilidade a infecções em pacientes com LES. Dentre estes polimorfismos genéticos, o do gene *MBL2* tem mostrado relevância ^{3, 4}. Ele é responsável pela síntese da lectina ligadora de manose (*mannose-binding lectin* - MBL) proteína chave em uma das vias do sistema de completo que contempla o sistema imune inato. Quando há variantes polimórficas deste gene, a síntese e a funcionalidade da MBL podem ficar comprometidas modificando seus níveis séricos ⁵.

A deficiência de MBL está relacionada com aumento do número de infecções em pacientes com LES sendo que este aumento não está relacionado com uso de imunossuppressores, fator de confusão nessa equação. Além disso, os processos infecciosos podem mimetizar e desencadear exacerbações do LES confundindo o diagnóstico e tratamento apropriados e ainda são responsáveis por grande morbimortalidade em pacientes com LES ^{6, 7, 8}.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estratégias para localizar e selecionar as informações

O objetivo desta revisão foi determinar as publicações que associam polimorfismos do gene *MBL2* com LES além reconhecer os dados até o momento presentes que associam os polimorfismos genéticos dessas proteínas com infecções graves e hospitalizações. A base de dados eletrônica do Pubmed/MEDLINE foi consultada até 01/11/2017, sem limitação quanto à data da publicação ou língua do artigo. Os seguintes termos e seus descritores correlacionados foram utilizados nas estratégias de busca:

((lupus erythematosus, systemic) AND mbl polymorphism)

((lupus erythematosus, systemic) AND mbl polymorphism) AND hospitalization

((lupus erythematosus, systemic) AND infection) AND mbl polymorphisms

A estratégia de busca inicial resultou em 50 resultados, os quais foram avaliados pela autora com relação à relevância ao questionamento proposto. Adicionalmente, foi realizada revisão das referências bibliográficas dos artigos citados no intuito de incluir possíveis artigos faltantes na primeira estratégia de busca. Foram excluídos artigos que apresentavam informações repetidas ou disponíveis em outros artigos. No total, 6 estudos foram considerados de maior relevância, conforme fluxograma exemplificado na figura 1.

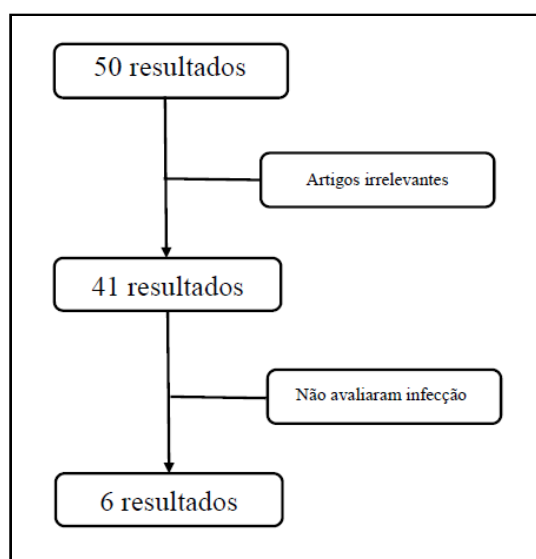


Figura 1. Fluxograma da estratégia de busca para localizar e selecionar as informações da pesquisa

2.2. Patogênese do LES

O sistema imune inato tem sua importância reconhecida e amplamente estudada na patogênese do LES, sendo um dos mecanismos envolvidos a ativação anormal do sistema de complemento, tendendo a um grau de autoinflamação e lesão em órgão alvo. A deficiência genética dos componentes iniciais da via clássica do complemento como C1q, C2 e C4 são um dos maiores fatores de risco genéticos conhecidos para o LES ⁹. Neste cenário, há uma redução da depuração do material apoptótico prolongando a exposição dos autoantígenos ao sistema imune tendo como consequência a formação de autoanticorpos e consequente inflamação sistêmica e lesão ¹⁰.

Além da via clássica do complemento, a via da lectina vem demonstrando sua importância no LES de forma mais recente através da proteína MBL integrante deste sistema.

2.3. MBL

A MBL é uma proteína sérica secretada pelo fígado como uma proteína de fase aguda e que está envolvida em uma das três vias do complemento - a via da lectina que compartilha semelhanças com a via clássica. Essa proteína pertence a superfamília das colectinas ¹¹. A MBL é uma molécula multimérica, em forma de *bouquet* com até 6 subunidades cada uma contendo três peptídeos idênticos ^{4,12}. Cada uma dessas subunidades é formada por um domínio de reconhecimento de carboidrato, uma região hidrofóbica no pescoço, uma região de colágeno e uma região N-terminal rica em cisteína. Essa organização é funcionalmente similar ao C1q e tem importante participação na imunidade inata. É responsável pela opsonização de micro-organismos ricos em manose levando a ativação de macrófagos, através da ligação do domínio de colágeno da MBL aos receptores nos fagócitos, com consequente fagocitose do patógeno. Pela ligação aos resíduos de carboidratos também ativa a cascata do complemento que leva a lise osmótica do agressor ¹³. Dessa forma, a MBL está envolvida na modulação inflamatória e na depuração de células apoptóticas.

A ativação da via do complemento da lectina ocorre independente dos anticorpos e se inicia com a ligação da MBL a glicoproteínas com manose, ficolina ou N-acetilglicosamina na superfície de muitos patógenos ^{14, 11}. Após essa ligação, um

conjunto de proteínas que circulam em associação com a MBL, denominadas serinoproteases associadas a MBL- MASP1 e MASP2, são ativadas e clivam C4 e C2. Como consequência, há a formação de C3 convertase. A ação desta última proteína sobre outras proteínas do complemento (C5, C6, C7, C8, C9) culmina na formação do complexo de ataque a membrana responsável por iniciar o processo de lise do patógeno agressor ¹⁵.

A MBL é codificada pelo gene *MBL2* localizado no cromossomo 10 que contém 4 exons. Cada exon é responsável pela codificação de uma parte da estrutura da MBL. O exon 1, região codificante, codifica a região rica em cisteína e parte da região de colágeno; o exon 2 o restante da estrutura de colágeno. Já o exon 3 codifica a região do pescoço da MBL e o exon 4 codifica o domínio de reconhecimento do carboidrato. A região promotora desse gene interfere na taxa de transcrição através dos elementos regulatórios contidos nesta região ¹⁰.

Existem alguns polimorfismos de nucleotídeos únicos deste gene relacionados a diferentes níveis séricos de MBL. Três deles estão localizados no exon 1 ou região codificante e outros 3 na região promotora e a combinação entre eles resulta diferentes alelos ¹⁰.

Os polimorfismos do exon 1 do gene *MBL2* estão localizados nos códons 54, 57 e 52 formando os alelos B, C e D, respectivamente, formando uma estrutura proteica menos estável e mais suscetível a degradação ^{16,17}. Isso se traduz em menores concentrações de MBL séricas e comprometimento da funcionalidade dessa proteína ³. Em conjunto, os alelos B, C e D são denominados alelos O. O alelo A, resultante da configuração habitual do exon 1/região codificante, é o alelo mais frequente na população geral e responsável por níveis séricos normais da MBL.

Já os polimorfismos nas regiões promotoras -550, -221 e +4 formam os alelos H/L, X/Y e P/Q. As combinações desses alelos resultam em 4 haplótipos: LXP, LYP, LYQ e HYP que podem interferir no nível sérico da MBL ⁵.

A interação dos 3 polimorfismos do exon 1 com os haplótipos resultantes dos polimorfismos na região promotora dão origem a mais 7 haplótipos diferentes (HYPA, LYPA, LYQA, LXPA, HYPD, LYPB e LYQC) ^{18, 19}. Os haplótipos HYPA e LYQA são associados com altos níveis de MBL, enquanto que os haplótipos LYPA e LXPA com níveis moderados e baixos, respectivamente ¹⁸.

A deficiência de MBL predispõe a episódios mais graves de infecção bacteriana e progressão de doenças virais crônicas resumindo desta forma a sua importância para a defesa imunológica dos indivíduos ¹⁶.

2.3.1. MBL e o LES

Assim como a deficiência de C1q, a deficiência da MBL pode predispor ao desenvolvimento do LES por alterar a depuração das células apoptóticas que persistem como estímulo antigênico assim resultando na apresentação anormal de antígenos ao sistema imune adaptativo ¹. Este pode ser o mecanismo, associado a maior propensão a infecção ⁸ e redução da depuração de imunocomplexos ¹¹, que envolve a MBL na patogênese do LES.

Alguns estudos observaram maior frequência dos polimorfismos do gene *MBL2* em pacientes com LES demonstrando aumento da suscetibilidade a essa doença quando presentes e a associação com diferentes manifestações clínicas ^{1, 20}. Mas há divergências entre esses dados quando avaliamos diferentes etnias. Para alguns autores o gene *MBL2* é mais um modificador da doença que estaria envolvido em uma progressão acelerada e não um locus de suscetibilidade verdadeira ^{16, 17, 18, 21, 22}.

Menor divergência há em relação aos polimorfismos do gene *MBL2*, redução dos níveis séricos de MBL e infecção em pacientes com LES.

2.3.2. Polimorfismos do gene *MBL2*, MBL sérica, LES e infecção

Pacientes com LES podem ter níveis séricos mais baixos de MBL atribuídos a presença de variantes genéticas do gene *MBL2* resultando em maior risco de infecções graves ^{16, 8, 23, 24, 9} mesmo de forma independente do uso de imunossupressores ²⁵. Apenas um estudo não demonstrou essa relação mas foi considerado o número pequeno de pacientes com variantes polimórficas envolvidas ²⁶.

Os alelos B e C resultantes dos polimorfismos da região codificante (exon 1) levam redução importante da MBL enquanto que o alelo D parece ter impacto mínimo na concentração plasmática da MBL ²⁷.

Dentre os polimorfismos, a variante Y da região promotora foi associada a níveis elevados de MBL sérica bem como o haplótipo HY, resultante da combinação de alelos polimórficos da região promotora ^{23, 28}. Em outro estudo, a presença do haplótipo HYP

foi associada a níveis séricos elevados da MBL e o haplótipo LXP, com baixos níveis dessa proteína ⁵.

O haplótipo YA, oriundo da fusão dos alelos A da região codificante e Y da região promotora foi relacionado com níveis elevados de MBL ²⁵. Outros haplótipos do exon 1 e da região promotora também foram associados a diferentes valores de MBL sendo níveis altos e moderados relacionados a LYA/A, HYA/A e LXA/LXA, LYA/O, HYA/O, respectivamente e LXA/O, O/O a deficiência de MBL sérica ²⁹. Essas constatações são importantes pois os níveis elevados de MBL demonstraram ser protetores para infecções em população pediátrica de pacientes com LES ³⁰.

Essa estreita relação entre polimorfismos do gene MBL2, diferentes níveis séricos de MBL e infecção pode ser importante no manejo clínico dos pacientes frequentemente expostos a tratamentos imunossupressores, pois as infecções podem contribuir para exacerbação do LES ou mimetiza-lo e ainda é umas das maiores causas de mortalidade nesses pacientes ^{8, 7}.

Tabela 1. Resumo dos principais artigos publicados avaliando polimorfismos do gene *MBL2*, níveis séricos de MBL e infecções em pacientes com LES.

Autores	Ano	Polimorfismos	Principais resultados
Ip, WK <i>et al</i> ²⁸	1998	Região promotora H/L e Y/X	Haplótipo HY tem níveis séricos altos de MBL**, LY valores intermediários e LX aos mais baixos
Garred, P <i>et al</i> ²³	1999	Exon 1*: alelos B, C, D (ou O) e A	Variante polimórfica (O/O) aumenta risco de infecções graves e tem MBL sérica baixa
Garred, P <i>et al</i> ⁹	2001	Exon 1: alelos B, C, D (ou O) e A	Presença do alelo polimórfico aumento risco de infecções graves em 2 anos de seguimento
Mok, MY <i>et al</i> ²⁵	2007	Exon 1: alelos A e B; Região promotora X e Y	MBL sérica baixa para haplótipo YB é fator de risco para infecções graves em Chineses
Takahashi <i>et al</i> ²⁴	2005	Exon 1: alelos A e B	Maior número de internações por infecção grave no haplótipo B/B (homozigoto para polimorfismo)
Kinder, BW <i>et al</i> ²⁶	2008	Exon 1: alelos B, C, D (ou O) e A	Sem associação entre polimorfismos do exon 1 e pneumonia

*Exon 1: também referenciada como região codificante; **MBL: *Mannose-binding lectin*

3. MARCO TEÓRICO

O LES é uma doença crônica com patogênese não totalmente compreendida onde alterações genéticas estão envolvidas. Dentre essas alterações os polimorfismos do gene *MBL2* já demonstrou importância na suscetibilidade a doença e relação com processos infecciosos nesses pacientes. Devido ao grande impacto das infecções na mortalidade de pacientes com LES é importante identificarmos fatores relacionados na nossa população.

4. JUSTIFICATIVA

O LES é uma doença inflamatória crônica que acomete principalmente mulheres jovens e o tratamento, muitas vezes, envolve uso de medicações imunossupressoras. Neste contexto, o risco de infecções aumenta de maneira expressiva e, não raramente, leva o paciente a internações e morte. Isto também ocasiona maiores custos sociais e econômicos ao país. O papel da MBL como determinante de maior suscetibilidade a infecções ainda vem sendo explorado em diferentes centros no mundo. Acredita-se que determinados polimorfismos genéticos envolvendo os genes *MBL2* possam estar associados com maior ou menor risco de infecções em pacientes com LES. Desta forma, considerando a ausência de informações locais sobre o assunto e impacto negativo das infecções na morbimortalidade de pacientes com LES, justifica-se um estudo clínico para avaliar a relação entre os diferentes polimorfismos do gene *MBL2* e infecções graves em pacientes com LES acompanhados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo primário

Avaliar a ~~relação~~ associação entre polimorfismos do gene *MBL2* e infecções graves em pacientes com LES acompanhados no Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre na última década.

5.2. Objetivo secundário

Avaliar número de internações e tempo de internação para tratamento de infecções de acordo com polimorfismos do gene *MBL2*.

Comparar diferenças demográficas, clínicas e genéticas entre os pacientes internaram para tratamento de infecção grave e os que não internaram.

Definir número total de internações, tempo de permanência internado e dose cumulativa de corticoide utilizados até 3 meses antes das internações.

6. REFERÊNCIAS

1. Xu W-D, Peng H, Zhou M, et al. Association of RANTES and MBL gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Mol Biol Rep.* 2013;40(2):941-948. doi:10.1007/s11033-012-2135-5.
2. Panda AK, Parida JR, Tripathy R, Pattanaik SS, Ravindran B, Das BK. Mannose binding lectin: a biomarker of systemic lupus erythematosus disease activity. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(5):R218. doi:10.1186/ar4057.
3. Jönsen A, Bengtsson AA, Sturfelt G, Truedsson L. Analysis of HLA DR, HLA DQ, C4A, FcγRIIa, FcγRIIIa, MBL, and IL-1Ra allelic variants in Caucasian systemic lupus erythematosus patients suggests an effect of the combined FcγRIIa R/R and IL-1Ra 2/2 genotypes on disease susceptibility. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(6):R557-562. <http://arthritis-research.com/content/6/6/R557>.
4. Jakab L, Laki J, Sallai K, et al. Association between early onset and organ manifestations of systemic lupus erythematosus (SLE) and a down-regulating promoter polymorphism in the MBL2 gene. *Clin Immunol.* 2007;125(3):230-236. doi:10.1016/j.clim.2007.08.020.
5. Pradhan V, Surve P, Ghosh K. Mannose Binding Lectin (MBL) in autoimmunity and its role in Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *J Assoc Physicians India.* 2010;58:688-690.
6. Tektonidou MG, Wang Z, Dasgupta A, Ward MM. Burden of Serious Infections in Adults With Systemic Lupus Erythematosus : A National Population-Based Study , 1996 – 2011. 2015;67(8):1078-1085. doi:10.1002/acr.22575.
7. Hendler JV, de Souza L, de Freitas Zernow DC, et al. Survival analysis of patients with systemic lupus erythematosus in a tertiary hospital in southern Brazil. *Clin Rheumatol.* 2017;36(9):Epub ahead of print. doi:10.1007/s10067-017-3735-1.
8. Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y, Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Infections and SLE. *Autoimmunity.* 2005;38(7):473-485. doi:10.1080/08916930500285352.
9. Garred P, Voss A, Madsen HO, Junker P. Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Genes Immun.* 2001;2(8):442-450.
10. Monticielo OA, Mucenic T, Xavier R., Brenol JCT, Chies JA. The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2008;27:413-419.
11. Huang YF, Wang W, Han JY, et al. Increased frequency of the mannose-binding lectin LX haplotype in Chinese systemic lupus erythematosus patients. *Eur J Immunogenet.* 2003;30(2):121-124. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648279>. Accessed November 20, 2017.
12. Tsai Y, Yao T, Kuo M, Cheng T, Huang J. Lack of association of mannose-binding lectin gene polymorphisms with development and clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in Chinese children. *Lupus.* 2009;18(4):372-376. doi:10.1177/0961203308099326.

13. Christiansen OB, Nielsen HS, Lund M, Steffensen R, Varming K. Mannose-binding lectin-2 genotypes and recurrent late pregnancy losses. *Hum Reprod.* 2009;24(2):291-299. doi:10.1093/humrep/den377.
14. Weiss G, Madsen HO, Garred P. A Novel Mannose-binding Lectin-associated Serine Protease 1/3 Gene Variant. *Scand J Immunol.* 2007;65(5):430-434. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.01925.x.
15. Pradhan V, Surve P, Rajadhyaksha A, et al. Mannose binding lectin (MBL) 2 gene polymorphism & its association with clinical manifestations in systemic lupus erythematosus (SLE) patients from western India. *Indian J Med Res.* 2015;141(2):199-204.
16. Tsutsumi A, Sasaki K, Wakamiya N, et al. Mannose-binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. *Genes Immun.* 2001;2(2):99-104. <https://www.nature.com/articles/6363744.pdf>. Accessed November 20, 2017.
17. Hristova M, Dourmishev L, Kamenarska Z, et al. MBL2 polymorphisms - manifestations in Bulgarian patients with adult dermatomyositis and systemic lupus erythematosus. *Int J Immunogenet.* 2014;41(2):119-125. doi:10.1111/iji.12093.
18. García-Laorden MI, Rúa-Figueroa I, Pérez-Aciego P, et al. Mannose binding lectin polymorphisms as a disease-modulating factor in women with systemic lupus erythematosus from Canary Islands, Spain. *J Rheumatol.* 2003;30(4):740-746. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12672193>. Accessed November 20, 2017.
19. Monticelo OA, Chies JA., Mucenic T, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphism in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2010;(19):280-287.
20. Villarreal J, Crosdale D, Ollier W, et al. Mannose binding lectin and FcγRIIIa (CD32) polymorphism in Spanish systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford).* 2001;40(9):1009-1012.
21. Sandrin-Garcia P, Brandão LAC, Coelho AVC, et al. Mannose binding lectin gene (MBL2) functional polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in southern Brazilians. *Hum Immunol.* 2011;72:516-521.
22. Seelen MA, van der Bijl EA, Trouw LA, et al. A role for mannose-binding lectin dysfunction in generation of autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology.* 2005;44(1):111-119. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479757>. Accessed November 20, 2017.
23. Garred P, Madsen HO, Halberg P, et al. Mannose-Binding Lectin Polymorphisms and Susceptibility to Infection in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1999;42(10):2145-2152.
24. Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, et al. Association of mannose binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(2):311-314.
25. Mok MY, Eddie IP W., Lau CS, Lo Y, Wong WHS, Lau YL. Mannose-Binding Lectin and Susceptibility to Infection in Chinese Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol.* 2007;34(6):1270-1276.

26. Kinder BW, Freemer MM, King Jr TE, et al. Clinical and Genetic Risk Factors for Pneumonia in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2007;56(8):2679-2686.
27. Piao W, Liu C-C, Kao AH, et al. Mannose-binding lectin is a disease-modifying factor in North American patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 2007;34(7):1506-1513.
28. Ip W, Chan S, Lau C, Lau Y. Association of systemic lupus erythematosus with promoter polymorphisms of the mannose-binding lectin gene. *Arthritis Rheum.* 1998;41(9):1663-1668.
29. Glesse N, Monticielo OA, Mattevi V., et al. Association of the mannose-binding lectin 2 gene polymorphic variants with susceptibility and clinical progression in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2011;29:983-990.
30. Tsai Y, Yeh K, Yao T, YL H, Kuo M, Huang J. Mannose-binding lectin expression genotype in pediatric-onset systemic lupus erythematosus: associations with susceptibility to renal disease and protection against infections. *J Rheumatol.* 2011;38:1429-1435.

7. ARTIGO EM INGLÊS

***MBL2* gene polymorphisms and its association with infection in Brazilian systemic lupus erythematosus patients: a 10-year study**

¹Carla Forgiarini Saldanha, ²Gabriela Kniphoff da Silva, ²Nadine Glesse, ¹João Carlos Tavares Brenol, ²José Artur Bogo Chies, ¹Odirlei André Monticieleo

¹Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

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

Correspondence address:

Carla Forgiarini Saldanha

Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – Largo Eduardo Zaccaro Faraco, Sala 645, 6º andar, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil - 90035-903

Telephone/Fax: 55 51 33313834

E-mail: saldanhacf@yahoo.com.br

Abstract

Introduction: Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multifactorial disease and *MBL2* genetics variants potentially affect its etiology and increase infection risk in this population.

Objective: To evaluate the relation of *MBL2* gene polymorphisms of the coding and promoter region and their respective haplotypes on hospitalization, number of admissions and days of admission for major infection causes in Brazilian SLE patients.

Methods: Three hundred and twenty-five SLE patients from a southern Brazilian outpatient SLE clinic were genotyped in 2006 for *MBL2* gene polymorphisms from coding and promoter region (rs1800450, rs1800451, rs5030737, rs11003125, and rs7096206) and followed until 2016. Clinical and laboratory data from each patient was obtained and information regarding the need for hospitalization, the number of admissions and amount of days admitted for infection treatment were compiled and compared with *MBL2* gene polymorphisms and haplotypes. A linear regression analysis was constructed considering the variables of bivariate which demonstrated an association ($p < 0.05$) and variables which had a theoretical basement.

Results: No difference was found in polymorphism prevalence when comparing the group that was admitted for infection treatment and the group who did not. Allele C, and haplotypes LY and HY correlated with more infection hospitalizations (normal homozygosis for C: 2 (IQR 1-3), heterozygosis for C: 3 (IQR 2-6) $p=0.038$; LY 2 (IQR 1-3) $p=0.049$; HY 2 (IQR 1-3) $p=0.005$) and haplotype HY staid fewer days in hospital for infection treatment: 18 (IQR 10-38) $p=0.041$. When linear regression was applied HY associated with shorter admissions for infections (-18.11 days, $p=0.021$) and HY (-1.52 admission, $p 0.001$) with older age at diagnosis had less admissions for infection (HY regression model: -0.42, $p=0.006$; LY regression model -0.04, $p=0.010$; -0.04, $p=0.013$).

Conclusion: The presence of the HY promoter haplotype leads to fewer in hospital care for infection treatment probably due to higher MBL plasma levels. Also, HY haplotype and older age at SLE diagnosis is related to less admissions for infection. It is important to consider that infection is a very import cause of mortality in SLE patients and not only related to aggressive immunosuppressive treatment.

Key Words: Systemic Lupus Erythematosus, Mannose-Binding Lectin, Infections, Hospitalization, Genetics and Immunology

INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory multisystem disease characterized by periods of activity and remission. Its etiology is not totally understood but it is known to result from the interaction of hormonal, environmental and genetic factors ^{1,2}.

Genes that code molecules of the complement system were already suggested as playing important roles in the SLE physiopathology. One of these genes, *MBL2*, is responsible for the expression of the mannose-binding lectin (MBL) molecule. It was theoretically assumed that the deficiency of complement proteins leads to a prolonged exposition to autoantigens, which takes to higher autoantibody production due to a lack of depuration of such autoantigens ³.

MBL2 gene is located at the chromosome 10 and is composed by four exons. Polymorphisms at exon 1 and in the promoter region influence MBL plasma levels by the abnormal interaction of transcribed alleles ⁴.

Polymorphisms of the *MBL2* gene exon 1 (called alleles B, C and D) result in MBL molecules with a less stable structure, which are more susceptible to degradation. Polymorphisms are indicated as B (rs1800450), C (rs1800451) and D (rs5030737). The presence of any of the variants B, C or D is collectively called allele O, although the simultaneous absence of all variants characterizes the wild-type, or A allele. Promoter region polymorphisms can be assigned as alleles H/L (rs11003125), X/Y (rs7096206) and P/Q (rs7095891), and are associated to differential transcription rates of the *MBL2* gene⁵.

As previously mentioned, MBL plasma levels are influenced by the presence of polymorphic alleles from both exon 1 and the promoter region of the *MBL2* gene, as well as by the haplotypes resulting of the combination of such variants. The presence of allele B and C are associated with an important reduction of MBL serum levels, although allele D has a minimum impact on that. The HY promoter region haplotype is related to high MBL in plasma, although the LX haplotype correlates with low concentrations of this protein. Combination of the polymorphic alleles from exon 1 and those from the promoter region results in different haplotypes in which HYA/A and LYA/A are associated to high MBL plasma levels, and haplotypes LYA/0 and LXA/0 respectively to moderate and very low to deficient plasma levels ^{5,4}.

It is well established that MBL deficiency predisposes to major infections and that homozygous individuals to *MBL2* gene variants could present a higher risk for such

infections ^{3,6}. This is a quite relevant association, especially considering the frequent need of immunosuppressive drugs in infected patients, and the exacerbation of clinical symptoms in SLE patients associated to infection. Also of note is the fact that infection is still one of the major causes of death in SLE patients ¹. In this scenario, to well establish the relation of the *MBL2* gene polymorphisms and infection could lead to a better management of the SLE patient. Thus, the aim of the present study was to determine if *MBL2* gene polymorphisms from coding and promoter region associated with hospitalization, number of admission and days of admission for major infection causes in a cohort of SLE patients from the southernmost state of Brazil.

METHODS

Study Population

Three hundred and twenty-five consecutive SLE patients, 18 years old or over, were recruited at lupus clinic from Hospital de Clínicas de Porto Alegre a university hospital which is in southernmost state of Brazil, and which is a reference center in rheumatology. Patients were genotyped for *MBL2* gene polymorphisms of coding (exon 1) and promoter region performed by our group previously published ⁷⁵. All patients met the American College of Rheumatology revised criteria for SLE classification ². They were followed from January 2006 to December 2016, and information about admission was collected by chart review of this period. Chart review was performed with a standardized questionnaire to collect demographic, clinical and laboratory data. Thirty-four patients (10.47%) lost follow-up and were excluded.

Infection as a cause of hospitalization

Admission due to major infections was considered for those who stayed for more than 48 hours in hospital and were treated with antibiotics based on clinical, complementary tests and with clinical response to this treatment. This is the time lag used by the Brazilian public health system to define hospital admission since major infections need more than 48 hours of antibiotic regimens in hospital care.

Clinical and laboratory data

Demographic data like age at the diagnosis, age at the end of the study, ethnic origin, and sex was registered.

Information about SLE clinical manifestation included: malar rash, oral or nasal ulcers, arthritis, serositis (pleuritis and/or, pericarditis), nephritis, neurologic disorders (psychosis, seizures), hematologic disorders (hemolytic anemia, thrombocytopenia, leukopenia).

Laboratory evaluation included: antinuclear antibody with a titer >1:80, anti-dsDNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, anticardiolipin, lupus anticoagulant. SLEDAI and SLICC damage index⁸ were applied to each patient at the beginning of the study.

Information about SLE treatment along the disease course was collected, encompassing the use of methylprednisolone pulse therapy, cyclophosphamide, mycophenolate, azathioprine and antimalarial drugs. Also, data about treatment before admission was compiled, including the need of corticoids, cumulative dose of corticosteroids and the use of immunosuppressants (azathioprine, mycophenolate or cyclophosphamide) until 3 months before the admission.

Statistical analysis

Categorical data was presented as percentage and continuous variables as mean and standard deviation or median and interquartile range. The association between admissions due to infection, number of admissions and number of days hospitalized for infection treatment were made by Mann-Whitney or Kruskal-Wallis when appropriate.

Demographic, clinical and laboratory differences between those patients who were hospitalized for infection treatment from those hospitalized for other causes or not hospitalized, were analyzed by Qui-Square test with Yates correction, t-test for symmetrical variables and Mann-Whitney for asymmetrical variables.

The association between number of days admitted and number of hospitalizations for infection treatment with age at diagnosis, time of disease, clinical manifestations and treatment were accessed by Mann-Whitney for categorical variables and Spearman correlation test for continuous ones. Multiple linear regression was adjusted for those variables in which bivariate analysis demonstrated an association considering a $p < 0.05$ and variables which had a theoretical base. As age at the diagnosis and age are related variables ($r=0.82$, $p < 0.001$) the multiple linear regression was adjusted only the first one to avoid multi correlations. The genotypes related to the outcome variables after multivariate analyses were correlated to MBL plasma levels

according to haplotypic combination of exon 1 and promoter region of *MBL2* gene⁵. For all analyses statistical significance was considered if $p < 0.05$.

Ethic issues

The study protocol was approved by a local Ethics Committee and informed consent form was obtained from all participants at the beginning of the study or at the inclusion of new participants.

RESULTS

Along the ten years period of the study (from 2006 to 2016), one hundred and sixty-four patients were admitted, among which 101 were hospitalized due to major infections. In total, there were 194 admissions due to infection, since some patients needed hospitalization more than once. The median and interquartile range (IQR) of total days of in hospital care were 20 (12-42) and the median times of admissions for infection was 2 (1-3). Cumulative dose of corticoid 3 months before the first admission had a median of 1.8g (0.45-3.9), and this same parameter was 1.8g (0.45-4.8) and 1.57g (0.45-3.6) for the second and the third events of hospitalization.

Baseline clinical, laboratory and genetic features of patients who needed hospitalization against those who did not, are shown in Table 1. A tendency of more frequent hospitalization due to infections was seen for patients ethnically classified as European-derived, although this do not reach statistical significance. Patients who were admitted for major infection treatment were younger, had lower disease duration and more accrual damage at the beginning of the study. Besides nephritis, neurological and hematological disorders were also more frequent in the group admitted due to infections. Positivity to anti-Ro and anti-La antibodies, as well as the presence of any immunological abnormality were higher amongst the patients who needed hospitalization. Of note, they also received more frequently methylprednisolone pulses, as well as cyclophosphamide and azathioprine treatments along the disease. As expect, patients admitted for infection treatment presented a higher mortality rate as compared to patients without infections.

No difference was observed regarding allelic and haplotype frequencies in relation to admission for infection treatment. Nevertheless, when considering the total number of admissions for infection treatment and duration of hospitalization computed

by the number of days, a higher frequency of allele C, and both haplotypes LY e HY was associated with more infection hospitalizations and individuals with the HY haplotype staid fewer days in hospital for infection treatment (Table 2). These results were used to build a multivariate model with other variables related to the number of admissions and to the number of days admitted for infection treatment in the bivariate analyses. Linear regression demonstrated that patients with the HY haplotype remained eighteen days less at infection treatment as compared with individuals bearing the remaining haplotypes (Figure 1). Also, the presence of the HY haplotype and older age at the time of diagnosis correlated with fewer infection admissions (Table 3). As patients with the HY haplotype had shorter and fewer hospitalizations for infection treatment, it was evaluated the HY association with high MBL levels haplotypes ($p < 0.003$).

DISCUSSION

In this study the presence of the HY haplotype was an independent factor which correlated to shorter periods of hospitalization for infection treatment as well as fewer admissions when also considering older age at time of diagnosis in our SLE cohort. Also, the HY haplotype was correlated with coding *MBL2* gene variants which confer high MBL plasma levels, suggesting that its presence is an important factor on the regulation of the MBL expression. Of note, this is the first demonstration of a correlation between the number of days under treatment for infection and *MBL2* gene polymorphisms.

Some studies support that genetic factors may increase the risk for serious infections in adult patients with SLE ⁶ including some polymorphisms of the *MBL2* gene ^{9,10,11,12,13,14}. Considering MBL polymorphisms it seems that ethnicity is not so important for infection as it is for SLE susceptibility and other clinical features ^{4,15}.

It was demonstrated ^{10,9} that the presence of the Y allele associates to higher MBL plasma levels but in such works the H allele was not evaluated. Thus, according to Ip et al. a correlation between high MBL serum levels is driven by the HY haplotype, and not only by the H allele. Also, a study with SLE children suggested that high MBL expression genotype has a protective role against infection ¹⁶. We showed an association between HY and coding and promoter region haplotypes of *MBL2* gene related to higher MBL levels ⁵. In this sense, our results are in accordance with these

previous data, and this could justify fewer and shorter admissions for infections in HY individuals.

Mok et al. demonstrated an inverse relation between MBL levels according to *MBL2* gene genotype of coding and promoter region and number of major bacterial infections. The highest MBL levels were associated with the YA haplotype⁹. Garred et al showed that homozygosity for polymorphisms of the coding region for *MBL2* gene was associated with and increased risk for complicating infections in SLE patients^{10,14}. Similar results were observed by Takahashi et al related to allele B¹². In our cohort, patients heterozygous to allele C, were admitted more frequently for major infection treatment as compared to non-carriers of this variant, although after adjusting the analysis for other variables this association lost statistical significance.

Same discrepancy is found in the literature like a study that the authors did not found a relation between MBL polymorphisms and pneumonia in SLE patients but they only analyzed the coding region of the gene¹¹. But the authors considered that the small number of patients with polymorphic abnormalities could have influenced the result.

In the group of patients who were admitted for infection treatment we found a higher SLICC index score, shorter disease duration, more aggressive disease and a high death index as compared to the group of patients who were not hospitalized. Nevertheless, it is important to mention that no differences regarding *MBL2* gene polymorphisms genotypes were observed between these groups. In the other studies no difference was found in polymorphism prevalence between patients with and without major infection¹¹ but they had longer disease duration⁹ and one author showed more polymorphic variants in the group who got major infection^{10,14}.

Same limitations must be considered like the study design, an observational study, and mistakes in chart registry mostly. We didn't have many losses in the period of the study anyway. The outcomes variables (admission, number of admissions and days admitted for infection treatment) are simple to collect and have a reliable registry in the electronic chart program of our institution minimizing the possible errors due to it. Also, the population studied is of great ethnical diversity, but the data obtained are in agreement with the international literature. Besides, ethnicity does not seem to influence infections risk related to the polymorphisms of the *MBL2* gene.

In conclusion, the presence of the HY promoter haplotype of *MBL2* gene in SLE patients leads to shorter admissions for infection treatment probably because HY is related to high MBL expression genotypes. Also, the presence of HY haplotype and

older age at SLE diagnosis is related to less admissions due to infection. This is important considering that infection is a very important cause of mortality in SLE patients and not only related to aggressive immunosuppressive treatment.

Acknowledgements

This study was partially supported by grants from Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Table 1. Baseline features of SLE patients admitted for major infection treatment and patients who did not.

Patients' features ^a	Total (n=290)	Admission for major infection n=101 (100%)	No admission for major infection n=189 (100%)	p-value ^b
Female	268 (92.4)	96 (95)	172 (91)	0.314
European derived	216 (74.5)	68 (67.3)	148 (78.3)	0.570
Age ^c	42 ± 14.1	39 ± 14.3	43 ± 13.8	0.016
Disease duration ^c	31.2 (22.6-42.1)	17 (12-24)	18 (15-26)	0.022
SLE involvement				
SLICC ^d	1 (0-2)	1 (0-3)	0 (0-1)	<0.001
SLEDAI ^e	1 (0-4)	2 (0-4)	0 (0-4)	0.060
Malar rash	158 (54.8)	58 (58)	100 (53.2)	0.512
Arthritis	244 (84.7)	88 (88)	156 (83)	0.339
Neurological disorders ^f	35 (12.2)	17 (17)	18 (9.6)	0.100
Serositis	91 (31.6)	46 (46)	45 (23.9)	<0.001
Nephritis	124 (43.1)	56 (56)	68 (36.2)	0.002
Hematologic disorders ^g	230 (79.9)	87 (87)	143 (76.1)	0.040
Laboratory data				
ANA	284 (98.6)	99 (99)	185 (98.4)	0.999
anti-dsDNA	139 (48.3)	54 (54)	85 (45.2)	0.195
anti-Sm	57 (19.8)	2 (25)	32 (17)	0.144
anti-Ro/SSA	113 (7.3)	16 (18.2)	16 (9.6)	0.002
anti-La/SSB	32 (12.5)	16 (18.2)	16 (9.6)	0.026
Immunologic alterations	190 (66)	75 (75)	115 (61.2)	0.026
SLE treatment at any time of the disease				
Antimalarial	250 (97.6)	96 (96)	184 (98.4)	0.394
Mycophenolate	16 (5.6)	9 (9)	7 (3.7)	0.112
Methylprednisolone pulse therapy	89 (31)	51 (51)	38 (20.3)	<0.001
Cyclophosphamide	102 (35.4)	48 (48)	54 (28.7)	0.002
Azathioprine	145 (50.3)	66 (66)	79 (42)	<0.001
Coding region <i>MBL2</i> gene alleles				
B				
Normal Homozygous	216 (74.2)	77 (76.2)	138 (73)	
Heterozygous	67 (23.0)	21 (20.8)	46 (24.3)	0.780
Mutant Homozygous	8 (2.7)	3 (3)	5 (2.6)	
C				
Normal Homozygous	263 (90.4)	91 (90.1)	171 (90.5)	
Heterogeneous	28 (9.6)	10 (9.9)	18 (9.5)	0.999
D				
Normal Homozygous	247 (84.9)	90 (89.1)	156 (82.5)	
Heterozygous	41 (14.1)	11 (10.9)	30 (15.9)	0.213
Mutant Homozygous	3 (1.0)	0 (0)	3 (1.6)	
Promoter <i>MBL2</i> gene haplotypes				
LX	187 (64.7)	31 (31.3)	71 (37.6)	0.355
LY	80 (27.7)	70 (70.7)	211 (73.5)	0.709
HY	186 (64.4)	71 (71.7)	114 (60.3)	0.074
Non-survivors, over 10 years	26 (9.0)	16 (16)	10 (5.3)	0.006

^a Frequencies of all patients and the ones who were admitted or not for major infection treatment; ^b Chi-Square test with Yates correction between patients admitted and no admitted for major infection treatment, statistical significance was considered with a p-value <0.05; ^c years ± standard deviation; ^d SLICC: systemic lupus collaborating clinics, median (25th, 75th percentiles); ^e SLEDAI: score of disease activity, median (interquartile range); ^f neurological disorders: psychosis and seizures; ^g immunologic disorders: presence of at least one (anti-Ro, anti-La, anti-Sm, anti-dsDNA, anti-RNP, anticardiolipin, lupus anticoagulant, VDRL false negative, ANA)

*Some missing data could interfere in total number and percentages

Table 2. *MBL2* gene polymorphisms and haplotypes associated to admission, number of admissions and days admitted for infection treatment.

<i>MBL2</i> gene ^a	Admission due to infection		Number of admissions due to infection		Days admitted for infection treatment	
	N=101 (100%)	p-value ^b	Median (IR)	p-value ^b	Median (IR)	p-value ^b
Coding region/exon 1 alleles						
B						
Normal Homozygous	77 (76.23)		2 (1-3)		21 (11-46)	
Heterozygous	21 (20.79)	0.788	2 (1-3)	0.911	18 (13-35)	0.729
Mutant Homozygous	3 (2.97)		2 (1-3)		24 (12-36)	
C						
Normal Homozygous	91 (90)		2 (1-3)		20 (12-39)	
Mutant Heterogeneous	10 (9.99)	0.999	3 (2-6)	0.038	40 (14-77)	0.217
D						
Normal Homozygous	90 (89.10)		2 (1-3)		21 (13-45)	
Heterozygous	11 (10.89)	0.213	2 (1-3)	0.806	16 (8-38)	0.326
Mutant Homozygous	0		0		0	
Promoter region haplotypes						
LX	31 (30.69)	0.355	2 (1-3)	0.887	18 (9-36)	0.569
LY	70 (69.30)	0.709	2 (1-3)	0.049	20 (14-49)	0.055
HY	71 (70.29)	0.074	2 (1-3)	0.005	18 (10-38)	0.041

^a Frequencies according to admission for infection treatment and median and interquartile range for number of admissions for infection treatment and number of days in admission for infection; ^b Mann-Whitney test used when two variables were used for comparing and Kruskal-Wallis test when more than two variables were used for comparing. Statistical significance was considered with a p-value <0.05.

Table 3. Linear regression model for days admitted for infection and total admissions for infection treatment.

Variables ^a	Days admitted for infection ^b		Total admissions for infection ^b	
	Coef B (IC 95%) ^c	p-value ^d	Coef B (IC 95%) ^c	p-value ^d
Haplotype HY of <i>MBL2</i> gene	-18.11 (-33.48– -2.75)	0.021	-1.52 (-2.42– -0.62)	0.001
Haplotype LY of <i>MBL2</i> gene			0.64 (-0.26–1.55)	0.164
Allele C of <i>MBL2</i> gene			1.22 (-0.15– 2.60)	0.082
Serositis				
Haplotype HY regression model	14.00 (-0.006–28.02)	0.050	0.44 (-0.37–1.26)	0.280
Haplotype LY regression model			0.53 (-0.32–1.39)	0.221
Allele C regression model			0.55 (-0.28–1.39)	0.195
Nephritis				
Haplotype HY regression model	11.11 (-3.64–25.88)	0.138	-0.21 (-1.07–0.65)	0.629
Haplotype LY regression model			-0.01 (-0.91–0.88)	0.972
Allele C regression model			0.03 (-0.83–0.90)	0.937
Mycophenolate				
Haplotype HY regression model	11.44 (-14.33–37.21)	0.380	0.44 (-1.05–1.95)	0.557
Haplotype LY regression model			0.34 (-1.23–1.93)	0.664
Allele C regression model			-0.02 (-1.62–1.58)	0.979
Corticoid need until 3 months before admission				
Haplotype HY regression model	13.07 (-4.22–30.36)	0.136	0.67 (0.33–1.68)	0.187
Haplotype LY regression model			0.62 (-0.44–1.68)	0.249
Allele C regression model			0.53 (-0.51–1.58)	0.312
Age at diagnose				
Haplotype HY regression model	-0.40 (-0.98–0.17)	0.166	-0.042 (-0.08– -0.01)	0.006
Haplotype LY regression model			-0.04 (-0.08– -0.01)	0.010
Allele C regression model			-0.04 (-0.07– -0.009)	0.013
SLICC				
Haplotype HY regression model	1.70 (-2.5–5.9)	0.422	-0.04 (-0.29–0.19)	0.692
Haplotype LY regression model			-0.02 (-0.27–0.23)	0.869
Allele C regression model			-0.02 (-0.28–0.22)	0.831

^a Were listed variables with p-value <0.05 in bivariate analyses besides age that were used to construct the multivariate model; ^b Variables with a p-value <0.05; ^c coef B (IC 95%): coefficient B and confidence interval of 95%; ^d Statistical significance was considered with a p-value <0.05.

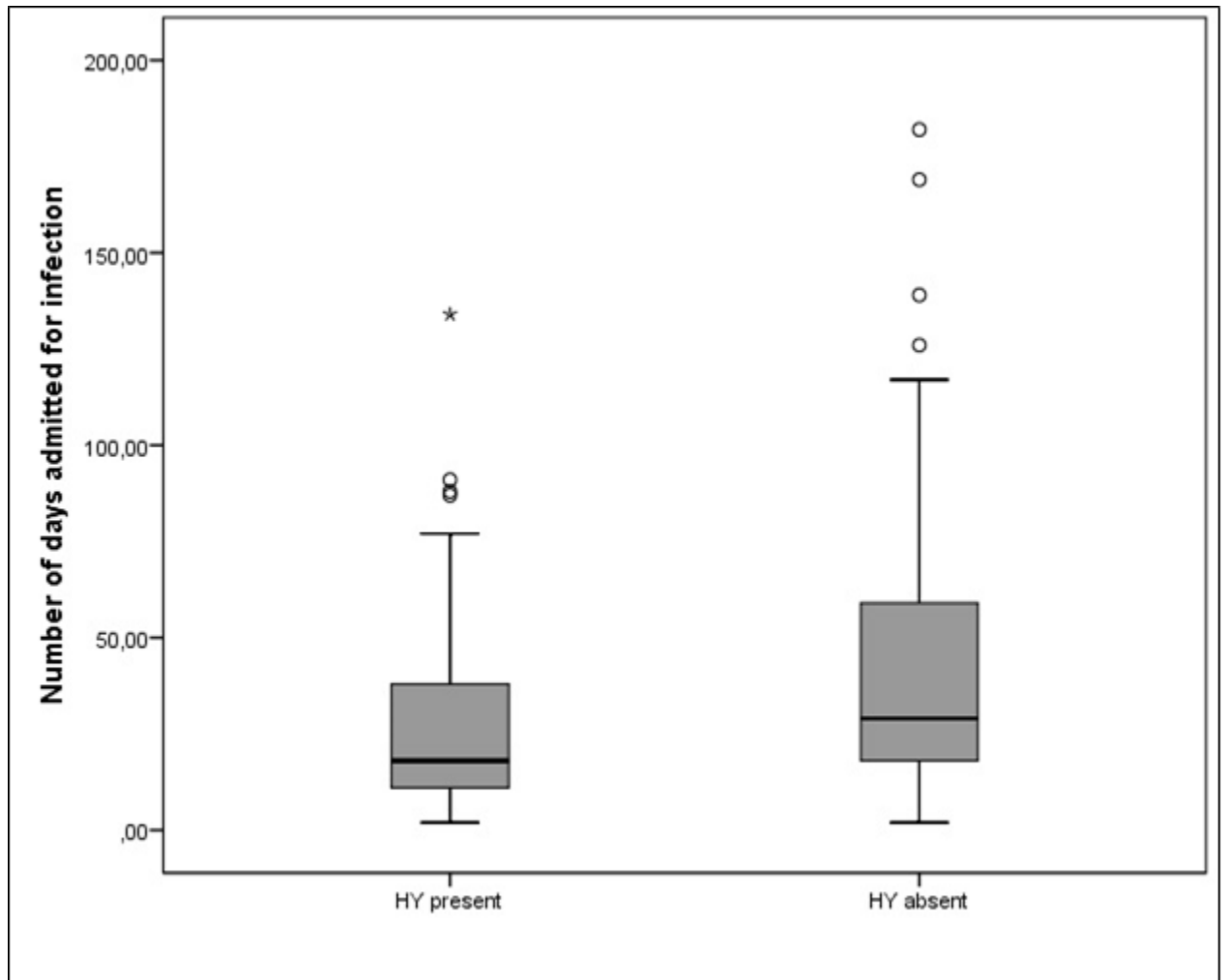


Figure 1. HY promoter haplotype of *MBL2* gene and its relation with days admitted for infection treatment.

REFERENCES

1. Hender JV, de Souza L, de Freitas Zernow DC, et al. Survival analysis of patients with systemic lupus erythematosus in a tertiary hospital in southern Brazil. *Clin Rheumatol*. 2017;36(9):Epub ahead of print. doi:10.1007/s10067-017-3735-1.
2. Hochberg M. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997;40(9):1725.
3. Pradhan V, Surve P, Ghosh K. Mannose Binding Lectin (MBL) in autoimmunity and its role in Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *J Assoc Physicians India*. 2010;58:688-690.
4. Monticielo OA, Mucenic T, Xavier R., Brenol JCT, Chies JA. The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 2008;27:413-419.
5. Glesse N, Monticielo OA, Mattevi V., et al. Association of the mannose-binding lectin 2 gene polymorphic variants with susceptibility and clinical progression in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2011;29:983-990.
6. Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Infections and SLE. *Autoimmunity*. 2005;38(7):473-485.
7. Monticielo OA, Chies JA., Mucenic T, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphism in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2010;(19):280-287.
8. Dayal N, Gordon C, Tucker L, Isenberg D. The SLICC Damage Index: past, present and future. *Lupus*. 2002;11(4):261-265. doi:10.1191/0961203302lu190sa.
9. Mok MY, Eddie IP W., Lau CS, Lo Y, Wong WHS, Lau YL. Mannose-Binding Lectin and Susceptibility to Infection in Chinese Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol*. 2007;34(6):1270-1276.
10. Garred P, Madsen HO, Halberg P, et al. Mannose-Binding Lectin Polymorphisms and Susceptibility to Infection in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1999;42(10):2145-2152.
11. Kinder BW, Freemer MM, King Jr TE, et al. Clinical and Genetic Risk Factors for Pneumonia in Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2007;56(8):2679-2686.
12. Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, et al. Association of mannose binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(2):311-314.
13. Ip W, Chan S, Lau C, Lau Y. Association of systemic lupus erythematosus with promoter polymorphisms of the mannose-binding lectin gene. *Arthritis Rheum*. 1998;41(9):1663-1668.
14. Garred P, Voss A, Madsen HO, Junker P. Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Genes Immun*. 2001;2(8):442-450.
15. Lee YH, Witte T, Momot T, et al. The mannose-binding lectin gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2005;52(12):3966-3974.
16. Tsai Y, Yeh K, Yao T, YL H, Kuo M, Huang J. Mannose-binding lectin expression genotype in pediatric-onset systemic lupus erythematosus: associations with susceptibility to renal disease and protection against infections. *J Rheumatol*. 2011;38:1429-1435.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O atual estudo demonstrou que a presença do haplótipo da região codificante e promotora HY do gene *MBL2*, sabidamente associado com níveis mais elevados de MBL sérica, reduz o tempo de internação e o número de internações por infecções graves em dez anos nos pacientes com LES estudados.

Embora as claras limitações de um estudo retrospectivo realizado através de revisão de prontuários médicos, este é o primeiro estudo na literatura com uma década de acompanhamento em pacientes com LES ocidentais que corrobora influencia genética no risco de infecções graves nesses pacientes, não ficando apenas restrito ao uso de medicamentos imunossupressores, em especial corticoterapia em doses imunossupressoras.

Considera-se cada vez mais ponderadamente o uso de doses elevadas de corticoides mesmo no tratamento de manifestações graves do LES algumas vezes de extrema necessidade para controlar atividade de doença importante, mas nem sempre necessária ou devidamente individualizada. Estes resultados servirão para individualizarmos cada vez mais a tomada de decisão terapêutica, elevando o risco de infecções graves e sua morbimortalidade atrelada a outro patamar.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

O resultado desse estudo reforça que o leque na interpretação do risco de infecções graves em pacientes com LES pode ser maior que o previamente conhecido por nós e convida novamente para buscarmos estratégias afim de contornar esse risco ao ponto de diminuí-lo.

Esse caminho só poderá ser planejado se trouxermos a luz o máximo de variáveis, que possam contribuir para o aumento ou redução de risco de infecções como outras variantes genéticas, por exemplo, mas principalmente aquelas em que o médico e paciente possam intervir ativamente ao ponto de gerar impacto individual e coletivo na redução de infecções graves e seus desfechos. Então devemos focar no maior conhecimento de determinantes de risco de infecções graves nos pacientes com LES.

Também é importante dar continuidade no acompanhamento desses pacientes a fim de compreender se há maior impacto na mortalidade e no dano acumulado pela doença com maior tempo de seguimento.

10. ANEXOS

Anexo I. Protocolo de coleta de dados.

PROTOCOLO LES MBL/CCR5 Parte 1

Nome: _____ Prt: _____
 Sexo: (1) Fem (2) Masc Raça: (1) Branco (2) Não branco
 Dt nasc: _____ Dt início dos sintomas _____
 Idade início sintomas _____ Dt Dx _____
 Idade Dx _____ Dt início HCPA _____
 Tel _____ Mora em POA (1) Não (2) Sim

DADOS SOROLÓGICOS:

FAN 1-Não 2-Sim	Padrão:1-NPF 2-NPG 3-Nucleo 4.....	Título	
SOROLOGIAS	1-NÃO	2-SIM	3.INDETERMINADO
1- Anti DNA			
2- Anti Sm			
3- Anticardiolipinas			
4- LAC			
5- VDRL			
6- Anti-Ro			
7- Anti-La			
8- Anti-RNP			
9- Anti Scl70			

MANIFESTAÇÕES DO LES ATÉ O MOMENTO

MUCOCUTÂNEAS	1-NÃO	2-SIM
1-Rash malar		
2-LES discóide		
3-Fotossensibilidade		
4-Úlceras		
5-Vasculite cutânea, não tromb.		
6-Paniculite lúpica		
7-Lupus subagudo		
8-Alopecia		
MUSCULOESQUELÉTICA		
1-Artrite		
2-Artralgias		
3-Miopatia		
RESPIRATÓRIAS		
1-Pleurite		
2-Pneumonite/hemorragia alveolar		
3-HAP		
4-Pulmão encolhido		
CARDIOVASCULARES		
1-Pericardite		
2-Miocardite		
3-Raynaud		
4-Vasculite não trombótica		
NEUROLÓGICAS		
1-Psicose		
2-Convulsões		
3-Neuropatia periférica		
4-Mielite transversa		
HEMATOLÓGICOS		
1-Anemia hemolítica AI		
2-Leucolinfopenia		

3-Plaquetopenia		
4-Anemia não ferropênica, não hemol		

TGI	1-NÃO	2-SIM	
1-Serosite			
2-Hepatite lúpica			
3-Pancreatite			
NEFROLÓGICAS	1-NÃO	2-SIM	Tipo *
1-Nefrite lúpica			
2-Acidose tubular renal			

*Nefrite lúpica: 1- 1; 2-2; 3-3; 4-4; 5-5; 6-6; 7- 5+3; 8-5+4

HISTÓRICO MÉDICO

	1-NÃO	2-SIM	TIPO
1-HF LES	Tirar		
2-HF DCV	Tirar		(H<55 a e M<65 a)
3-HAS			
4-DM			
5-Obesidade			
6-Dislipidemia			
7-SAF definida			
8-Sd Sjogren			
9-Neoplasia			
10-Osteoporose			
11-Osteonecrose			
12-Catarata			
13-TVP			
14-TEP			
15-IRC tto clínico			
16-IRC em TSR			
17-Tx Renal			
18-Hipotiroidismo			
19-Dçs AI reumat		2-AR 3-ES 4-Miop Inflam 5-outras	
20-DCV			
21-HIV			
22-HCV			
23-HBV			
Gesta	Aborto	Tempo gestação: 1-1º trim 2- 2º trim 3- 3º trim	
Tabagismo	(1)Atual	(2) Ex-tab	(3) Não se aplica
Nº total de internações			

DCV: 2- Cardiopatia isquêmica; 3- DAOP; 4-AVC/AIT; 5-ICC sistólica; 6-ICC diastólica; 7- Stent; 8-Aneurisma Ao e ramos; 9- Estenose Ao e ramos

MEDICAMENTOS USADOS

	1-NÃO	2-SIM
Ciclofosfamida		
Metotrexate		
Azatioprina		
Antimalárico		
Micofenolato		
Ciclosporina		
Rituximabe		
IVIG		
Dapsona		
Danazol		
Talidomida		
Estatina		
Anticoagulação oral		
Antiagregante plaquetário		
Pulsoterapia com MP		
Glicocorticoíde	(1) Não (2)até 0,4mg/Kg/d (3) 0,5-0,9mg/Kg/d (4)>1mg/Kg/d	

Óbito: (1) Não (2) Sim	Ano _____	Idade óbito _____	Tempo de doença _____
Causa (1) Atividade (2) Infecção (3) Ativ+infec (4) DCV (5) Desconhecido			

Anexo II. Termo de consentimento livre e esclarecido.

Anexo III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**ESTUDO DOS POLIMORFISMOS DA LECTINA LIGADORA DA MANOSE NOS
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO E POSSÍVEIS ASSOCIAÇÕES COM AS
EXPRESSÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS DA DOENÇA**

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

Os portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) apresentam fatores genéticos implicados no seu surgimento e evolução. Este estudo está sendo realizado para tentar identificar possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de LES e existência de correlação com as manifestações clínicas.

DE QUE CONSTA O ESTUDO?

Será coletada uma amostra de sangue que será destinada à avaliação genética proposta pelo presente estudo. Mediante consentimento do paciente, também serão coletados 10 ml de sangue, que serão centrifugados e cujo soro resultante será armazenado, integrando a soroteca de LES, visando pesquisas futuras sem a identificação do paciente. O uso de parte do sangue para quaisquer outras finalidades é vetado.

QUAIS SÃO AS VANTAGENS DA PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

1. Avaliar fatores genéticos implicados na etiopatogênese do LES.
2. Colaborar para o avanço e progresso do conhecimento sobre a LES e alterações genéticas associadas.

QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS DA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO?

1. Comparecer ao hospital
2. Realizar punção venosa para coleta de sangue, que pode causar dor temporária e coleção de sangue na pele (equimose ou hematoma)

HÁ A POSSIBILIDADE DE ESTE ESTUDO CONTINUAR?

Este estudo foi planejado para encerrar em dezembro de 2007 e para avaliar o risco genético apenas através dos genes da lecitina ligadora da manose. No entanto, é possível que mais genes e outros fatores relacionados ao surgimento do LES possam ser analisados futuramente. Para tal, o paciente, através de um novo contato com a equipe pesquisadora, deverá autorizar novamente o uso da amostra já coletada e o novo projeto deverá ser avaliado pela Comissão de Ética em Pesquisa da instituição e Conselho Nacional de Ética em Pesquisa. Outra possibilidade é a de um novo contato com o paciente em 5 ou 10 anos para verificar a evolução da doença.

**HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA**

06/12/06
x 0649 1

DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE

- A. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma.
- B. A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir não participar.
- C. A decisão de não participar não interferirá no acompanhamento normal dos pacientes no Ambulatório, na Emergência nem na Internação do Hospital de Clínicas.
- D. O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, assinala com um "X" apenas uma das opções abaixo:

() Autorizo o uso dos dados desta pesquisa para análise dos genes relacionados à lectina ligadora da manose.

() Autorizo o uso dos dados desta pesquisa para análise dos genes relacionados à lectina ligadora da manose, e de outros genes relacionados etiopatogênese do LES que possam ser considerados relevantes dentro desta linha de pesquisa, desde que pelo mesmo grupo de pesquisa.

Paciente: _____

Registro: _____ Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Porto Alegre, ____ de _____ de 200_

Pesquisadores responsáveis: Prof. Dr. João Carlos T. Brenol.

Tel: (051) 2101 8340; FAX: (051) 3331 3834

Odirlei André Monticielo Tel: (051) 9652 6170

Comitê de Pesquisa e Ética em Saúde: Telefone: (051) 2101 8304

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
06/12/06
100433

Anexo III. Termo de confidencialidade para o uso de dados.



Termo de Compromisso para Utilização de Dados

Título do Projeto	Cadastro no GPPG

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, ____ de _____ de 200_.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura

Anexo IV. Declaração STROBE (*Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology*) - checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No	Recommendation
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract – Pg. 28 (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found – Pg. 28
Introduction		
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported – Pg. 30
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses – Pg. 31
Methods		
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper – Pg. 31
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection – Pg. 31
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> - Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up – Pg. 31 (b) <i>Cohort study</i> - For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable – Pg. 31-32
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group – Pg. 31-32
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias – Pg. 31
Study size	10	Explain how the study size was arrived at – Pg. 31
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why – Pg. 31-32
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding – Pg. 32 (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions – Pg. 32 (c) Explain how missing data were addressed – Pg. 31 (d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed – Pg. 31 (e) Describe any sensitivity analyses

Continued on next page

Results		
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed – Pg. 33 (b) Give reasons for non-participation at each stage – (c) Consider use of a flow diagram
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders – Pg. 33 (b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest – Pg. 36 (c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount) – Pg. 33
Outcome data	15*	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time – Pg. 33-34
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included – Pg. 33-34 (b) Report category boundaries when continuous variables were categorized – Pg. 33 (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period –
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses Pg. 34
Discussion		
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives – Pg. 34
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias – Pg. 35
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence – Pg. 34-35
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results – Pg. 35
Other information		
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based – Pg. 35