

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

TAMARA APARECIDA REIS FERREIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES DO LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO ATRAVÉS DE ABORDAGEM PROTEÔMICA**

Belo Horizonte

2015

TAMARA APARECIDA REIS FERREIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES DO LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO ATRAVÉS DE ABORDAGEM PROTEÔMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo C.P. de Toledo

Coorientadora: Profa. Dra. Héliida Monteiro Andrade

Belo Horizonte

2015

F383i Ferreira, Tamara Aparecida Reis.
Identificação de potenciais biomarcadores do Lúpus Eritematoso Sistêmico através de abordagem proteômica / Tamara Aparecida Reis Ferreira. – 2015.
119 f. : il.

Orientador: Vicente de Paulo C. P. de Toledo.
Coorientadora: Héli da Monteiro de Andrade.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Lúpus eritematoso sistêmico – Teses. 2. Doenças auto-imunes – Teses. 3. Marcadores biológicos – Teses. 4. Proteômica – Teses. 5. Eletroforese em gel – Teses. 6. Proteínas – Teses. I. Toledo, Vicente de Paulo C. P. de. II. Andrade, Héli da Monteiro de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.079



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

UFMG

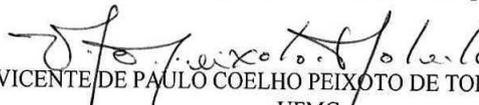
FOLHA DE APROVAÇÃO

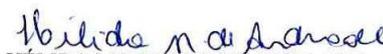
**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES DO LUPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO ATRAVÉS DE ABORDAGEM PROTEÔMICA**

TAMARA APARECIDA REIS FERREIRA

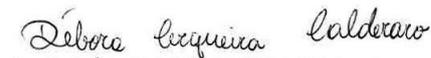
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 25 de setembro de 2015, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). VICENTE DE PAULO COELHO PEIXOTO DE TOLEDO - ORIENTADOR
UFMG


Prof(a). HÉLIDA MONTEIRO DE ANDRADE - COORIENTADORA
UFMG


Prof(a). CAMILA DIAS LOPES
UFMG


Prof(a). DÉBORA CERQUEIRA CALDERARO
UFMG

Belo Horizonte, 25 de setembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Ao ser supremo, pela vida e desafios superados. Obrigada, oh Pai, pelas pessoas abençoadas que colocou em meu caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vicente de Paulo C. P. de Toledo, pela oportunidade única. Obrigada por toda atenção, carinho e disponibilidade desde a graduação. Sou imensamente grata pelo projeto que me confiou. Sinto-me realizada e sei que o sucesso do grupo de pesquisa em Lúpus é inevitável.

À minha querida coorientadora, Prof^a. Dra. Héliida Monteiro Andrade, pelo exemplo de mulher, competência e otimismo. Obrigada por ter me acolhido com tanto carinho e sempre me fazer sentir melhor. Você merece todo o meu respeito e admiração.

Aos colaboradores do projeto, sem os quais a conclusão não seria possível: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Carvalho, Prof^a Tania Mara Pinto Dabés, Dr. Paulo Madureira, Dr. Donat Alexander Chapeaurouge e Dra. Monique Ramos de Oliveira Trugilho.

Aos professores e funcionários do PPGACT pelo conhecimento compartilhado.

Às amigas da primeira turma do PPGACT pela convivência harmoniosa, troca de experiências e apoio: Elaine, Simone, Flávia.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Clínica pela convivência e apoio: Marcela, Tatiana, Élide, Edilene, Larissa e Josimar.

Aos amigos que conquistei no Laboratório de Leishmanioses, por cada ensinamento, apoio, sofrimento compartilhado e momentos de descontração. Vocês fizeram toda diferença nessa conquista. Agradeço à Simone, Angélica, Jordana, Ramon, Elaine, Ana Paula, Adriana, João Carlos, Gabi, Maíra, Prof. Dr. Alexandre, Luiza e Henrique. Agradecimento especial e carinhoso à Ivana, Bruna e Júnior pelas ajudas inestimáveis.

Aos médicos do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte.

Aos colegas do grupo de pesquisa em Lúpus, pelo companheirismo, risadas e ajudas: Marcos, Karine, Cristina, Walter e Luan.

Aos meus pais e irmãos por sempre acreditarem em mim. Obrigada por me darem condições de estar onde eu quis chegar. Amo vocês!

Aos demais amigos que estiveram presentes de alguma forma: Damara, Deinha, Michelle, Hana, Carla, Kennedy.

Ao meu amado namorado, companheiro e amigo, Dartisson, pelo apoio incondicional. Seu amor me dá forças para nunca desistir do que pode nos manter unidos. Obrigada pela motivação e exemplo de determinação.

A todos os que contribuíram de alguma forma para minha formação.

Por fim, agradeço imensamente aos pacientes com Lúpus e outras doenças autoimunes por aceitarem contribuir com este trabalho!

*“A alegria não chega apenas no encontro do
achado, mas faz parte do processo de busca.”*

Paulo Freire

RESUMO

Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune do tecido conjuntivo com largo espectro de manifestações clínicas. A desregulação imune leva ao excesso de produção de auto-anticorpos e complexos imunes, ativação do complemento e inflamação tecidual persistente. Considerando que o diagnóstico atual depende da interpretação de complexos critérios estabelecidos pelo *American College of Rheumatology*, que o curso da doença é caracterizado por ativações e remissões imprevisíveis e que cada paciente desenvolve diferentes manifestações, o desenvolvimento de biomarcadores específicos torna-se urgentemente necessário. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou identificar candidatos a biomarcadores do LES ativo e LES inativo potencialmente capazes de distinguir laboratorialmente LES de outras doenças autoimunes. Empregou-se, de forma inédita, a técnica proteômica 2D-DIGE para avaliar a abundância diferencial de proteínas entre pacientes com LES ativo, LES inativo, portadores de outras doenças autoimunes e indivíduos saudáveis. Foram identificadas 103 proteínas diferencialmente abundantes. Dessas, 40 com abundância aumentada no LES ativo em relação aos demais grupos e 6 com abundância aumentada no LES ativo e no LES inativo em relação aos demais. Outras proteínas apresentaram aumento de abundância no LES em relação ao controle, mas não em relação a outras doenças autoimunes, o que requer maior rigor nas etapas de validação. Foram selecionadas como promissoras as proteínas *alpha-1-acid glycoprotein 1 / Orosomucoid 1*, *Zn-alpha2-glycoprotein*, *AMBP preproprotein*, *alpha-1-acid glycoprotein*, *apolipoprotein A-IV precursor*, *immunoglobulin kappa light chain*, *alpha-2-macroglobulin, chain A*, *Structure Of Prealbumin* e *immunoglobulin alpha-2 chain - fragment (Igα2)*, corroborando dados da literatura. Por outro lado, foram propostas, pela primeira vez, como potenciais biomarcadores do LES, as proteínas: *retinol-binding protein 4 isoform X1* e *SP-40,40 partial*. Vale destacar que este trabalho é um estudo preliminar e mais estudos complementares são recomendados para a confirmação e validação dos resultados.

Palavras-chave: Lúpus Eritematoso Sistêmico. Biomarcadores. Proteômica. 2D-DIGE. *Retinol-binding protein 4 isoform X1*. *SP-40,40 partial*.

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease of connective tissue with large spectrum of clinical manifestations. The immune deregulation leads to autoantibody and immune complexes overproduction, complement activation and persistent tissue inflammation as well. Considering that the current diagnosis depends on the interpretation of complex criteria established by the American College of Rheumatology, and that the disease course is characterized by unpredictable activations and remissions, and that each patient develops different manifestations, the discovery of specific biomarkers becomes urgently necessary. In this context, this study aimed to identify putative biomarkers for active and inactive SLE potentially capable to distinguishing laboratorial SLE from other autoimmune diseases. The 2D-DIGE proteomics technique was used in an unprecedented way, to evaluate the differential abundance of proteins between patients with active SLE, inactive SLE, patients with other autoimmune disease and healthy individuals. One hundred and three differentially abundant proteins were identified. From this amount, 40 with increased abundance in active SLE compared to the other groups, and 6 with increased abundance in active and inactive SLE in relation to the other ones. Other proteins showed increased abundance in SLE compared to the control group, but not in relation to other autoimmune diseases, which demand greater rigor in the validation steps. The following proteins: 1-acid glycoprotein 1 / Orosomucoid 1, Zn-alpha2-glycoprotein, AMBP preproprotein, alpha-1-acid glycoprotein, apolipoprotein A-IV precursor, immunoglobulin kappa light chain, alpha-2-macroglobulin, chain A, Structure Of Prealbumin e immunoglobulin alpha-2 chain - fragment (Igα2) were selected as promising biomarkers, corroborating data in the literature. On the other hand, proteins like retinol-binding protein 4 isoform X1 e SP-40,40 partial have been proposed for the first time, as potential biomarkers for SLE. It must be stressed that this work is a preliminary study. It is recommended that additional studies must be done to confirm and validate these data.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus. Biomarkers. Proteomics. 2D-DIGE; Retinol-binding protein 4 isoform X1. SP-40.40 partial.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Esquema da metodologia utilizada para análise proteômica. *Pools* de amostras (1); obtenção dos extratos proteicos (2); marcação das proteínas com corantes fluorescentes (3); isoeletrofocalização (4); 2D-SDS-PAGE (5); digitalização dos géis e obtenção das imagens para análises (6 e 7); análises das imagens (8); coloração dos géis e excisão dos *spots* com diferenças de intensidade (9); digestão por tripsina (10); identificação espectrométrica dos peptídeos (11); buscas em bancos de dados e organização dos dados proteômicos (12); proteínas com diferentes abundâncias (13). 46
- Figura 2 -** Média de idade dos indivíduos do estudo, por grupo. 47
- Figura 3 -** Gel SDS-PAGE 12% dos extratos proteicos obtidos dos grupos controle (C), de outras doenças autoimunes (O), LES ativo (A), LES inativo (I). MM: Padrão de massa molecular (Promega® V4891). 49
- Figura 4 -** Géis 2-DE, *strips* de 18 cm de comprimento, gradiente de pH 4-7, carregadas com 700 µg de proteínas e SDS-PAGE a 12% corados por *Coomassie Brilliant Blue* G-250. Grupos: controle (C), outras doenças autoimunes (O), LES ativo (A) e LES inativo (I). MM: Padrão de massa molecular (Promega® V4891). 50
- Figura 5 -** Imagens do 2D-DIGE (gel nº 2) adquiridas no scanner *Typhoon* FLA 9000 (GE-Healthcare). Foram utilizadas *strips* de 18 cm, gradiente de pH 4 – 7 com 50 µg de proteínas marcadas com os fluoróforos. Imagem em preto e branco de LES ativo (centro). (A) Mix das amostras (C+O+A+I) marcado com Cy2 utilizado para normalização, como controle interno da reação; (B) outras doenças autoimunes marcado com Cy3; (C) LES ativo marcado com Cy5; (D) sobreposição das três imagens (Cy2, Cy3 e Cy5). 52
- Figura 6 -** Imagens do 2D-DIGE (gel nº 3) adquiridas no scanner *Typhoon* FLA 9000 (GE-Healthcare). Foram utilizadas *strips* de 18 cm, gradiente de pH 4 – 7 com 50 µg de proteínas marcadas com os fluoróforos. Imagem em preto e branco de LES inativo (centro). (A) Mix das amostras (C+O+A+I) marcado com Cy2 utilizado para normalização, como controle interno da reação; (B) LES inativo marcado com Cy3; (C) controle marcado com Cy5; (D) sobreposição das três imagens (Cy2, Cy3 e Cy5). 53
- Figura 7 -** Diagramas de Venn mostrando o número de *spots* com intensidade aumentada por grupo em relação aos demais e as interseções entre os grupos. C: controle; O: outras doenças autoimunes; A: LES ativo; I: LES inativo. 56
- Figura 8 -** Imagem representativa da diferença de intensidade entre um *spot* do controle (A) e sua representação tridimensional (B), em relação ao mesmo *spot* do LES ativo (C) e sua representação tridimensional (D). *Spot* do controle (E) e sua demonstração tridimensional (F) menos intenso quando comparado ao mesmo *spot* do LES inativo (G) e sua demonstração tridimensional (H). Por fim, diferença de intensidade entre *spot* do LES ativo (I) e sua representação tridimensional (J) e LES inativo (K) e sua representação tridimensional. 57
- Figura 9 -** Agrupamentos hierárquicos (*Pattern Analysis*) entre os grupos de estudo, considerando-se os *spots* selecionados ($p \leq 0,05$) após testes T-*student* e *One-Way* ANOVA. Os valores de intensidade relativa estão exibidos na escala colorimétrica utilizando o log de abundância padronizado, com variação de -1 (regulado negativamente; verde) até 1 (regulado positivamente; vermelho). 58

- Figura 10** - Imagens geradas no Decyder™ representando os *spots* com intensidade aumentada ($p \leq 0,05$), por grupo analisado, selecionados após testes *T-sudent* e *One-Way ANOVA*. (C) *spots* com aumento de intensidade no grupo controle em relação aos demais; (O) *spots* com aumento de intensidade em outras doenças autoimunes; (A) *spots* com aumento de intensidade no LES ativo; (I) *spots* com aumento de intensidade no LES inativo. 59
- Figura 11** - Géis 2-DE utilizados para excisão de *spots* selecionados. Foram utilizadas *strips* de 18 cm de comprimento, gradiente de pH 4-7, carregadas com 700 µg de proteínas e SDS-PAGE a 12%. Os géis foram corados por *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Grupos: (C) controle; (O): outras doenças autoimunes; (A): LES ativo; (I): LES inativo. MM: Padrão de massa molecular (Promega® V4891). 60
- Figura 12** - Alinhamentos no BLASTp para proteínas de mesmo nome, mas *gi* diferentes. 72
- Figura 13** - Alinhamento realizado entre as proteínas 119, 120, 121 e 122 (*unnamed protein product*) utilizando-se o BLAST. 73
- Figura 14** - Resumo dos principais resultados obtidos. LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico; A: LES ativo; I: LES inativo; C: controle; O: outras doenças autoimunes; ↑: intensidade aumentada; ↓: intensidade diminuída. 77

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Programa de isoeletrofocalização utilizado para *strips* de 18 cm, pH 4-7 processado em equipamento *EttanIPGPhor™ 3* (GE-Healthcare) a 50 μ A/gel. 39
- Tabela 2** - Esquema de marcação dos extratos proteicos com *CyDye*: As amostras dos grupos C, O, A, I foram marcadas com 3 fluoróforos *CyDye* (Cy2, Cy3 e Cy5), de modo a ocorrer a inversão da marcação com diferentes fluoróforos e também obter 3 imagens de cada grupo permitindo as análises estatísticas. 41
- Tabela 3** - Tabela 3 - Critérios ACR apresentados pelos pacientes com LES no momento do diagnóstico. Dados obtidos após revisão de prontuários. 48
- Tabela 4** - Concentração proteica média dos extratos conforme dosagem com o 2D *Quanti Kit®* (GE-Healthcare). C: controle; O: outras doenças autoimunes; A: LES ativo; I: LES inativo. 49
- Tabela 5** - Número de *spots* com diferença de intensidade entre os grupos de estudos. C: controle; O: outras doenças autoimunes; A: LES ativo; I: LES inativo. 54
- Tabela 6** - Número de *spots* com diferença de intensidade, selecionados por grupo, e número de *spots* retirados do gel. C: controle; O: outras doenças autoimunes; A: LES ativo; I: LES inativo. 55
- Tabela 7** - Informações sobre os *spots* removidos para identificação espectrométrica por grupo em que apresentou aumento de intensidade. C: controle; O: outras doenças autoimunes; A: LES ativo; I: LES inativo. 61
- Tabela 8** - Correspondência entre os *spots* redundantes. C: controle; O: outras doenças autoimunes; A: LES ativo; I: LES inativo. 62
- Tabela 9** - Lista das proteínas identificadas, seus respectivos *gl*, número dos *spots* e aumento de abundância conforme comparações realizadas. 64

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

® - Marca comercial registrada

™ - Marca registrada

≤ - Menor ou igual a

% - Porcento

2DE – Eletroforese bidimensional

2D-DIGE - *Two-dimensional differential gel electrophoresis*

2D-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional

A2M – Alfa 2 macroglobulina

a.C – Antes de Cristo

ACR – *American College Rheumatology*

ANA – Anticorpo Antinuclear

ANOVA – Análise de variância

Anti-Sm – Anticorpo anti-Smith

ApoA-IV – Apolipoproteína A-IV

BCR – Receptor de célula B

BILAG – *British Isles Lupus Assessement Group*

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

BVA - *Biological Variation Analysis*

C3 – Fração C3 do complemento

C4 – Fração C4 do complemento

CH50 – Complemento Hemolítico total

CHAPS - [(3-Colamidopropil) dimetilamido]-1-propanosulfonato

CEM – Centro de Especialidades Médicas

COEP – Comissão de Ética em Pesquisa

cm - Centímetro

DIA - *Differential In-gel Analysis*

DMF - Dimetilformamida

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

DTT – Ditioneitol

ECG – Eletrocardiograma

ECLAM – *European Consensus Lupus Activity Measurements*

EDA - *Extended Data Analysis*

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EUA – Estados Unidos da América

FAN- Hep2 – Fator anti-núcleo utilizando célula Hep2

gi – Identificador *genInfo*

GO – *Gene Ontology*

h – Hora (s)

HCl – Ácido Clorídrico

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IAA - Iodoacetamida

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IEF – Focalização Isoelétrica

IFN - Interferon

IFN α – Interferon alfa

IL1 – Interleucina 1

IL8 – Interleucina 8

IL21 – Interleucina 21

IPG – *Immobilized pH Gradient*

KDa – Quilo Daltons

Kg - Quilograma

LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico

M – Molar

MAC – *Membrane Attack Complex* (Complexo de ataque a membrana)

MALDI – *Matrix-Assisted Laser Dissortion/Ionization*

MALDI-ToF-ToF - *Matrix-Assisted Laser Dissortion/Ionization Time of Flight/Time of Flight*

μL – Microlitro

min – Minuto (s)

mL - Mililitro

mM – Milimolar

MM – Massa Molecular

MS – Espectrometria de Massas

m/z – Relação massa/carga

NCBI – Centro Nacional para Informação em Biotecnologia (*National Center for Biotechnology Information*)

ng - Nanograma

nM - Nanomolar

NIH – *National Institute of Health*

OMS – Organização Mundial da Saúde

p.a – Para análise

PA – Pará

PBMC – Célula mononuclear do sangue periférico

PCDT – Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas

pg - Picograma

pI – Ponto Isoelétrico

PMF – *Peptide Mass Fingerprint*

pmol/μL – Razão picomol por microlitro

PR - Paraná

RBP – *Retinol Binding Protein*

RBP4 – *Retinol Binding Protein 4*

RN – Rio Grande do Norte

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – Rotações por minuto

SAAF – Síndrome do Anticorpo anti-Fosfolípedes

SC5b-9 – Complexo terminal do complemento

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE – Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

SFI – *Selena Flare Index*

SLAM-R – *Systemic Lupus Activity Measure Revised*

SLEDAI – *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*

SLICC – *Systemic Lupus International Collaborating Clinics*

SP-40,40 – Serino Protease 40,40

TA – Temperatura ambiente

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TLR – Toll Like Receptor (Receptor do tipo Toll)

ToF – *Time-of-Flight*

TTR - Transtirretina

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UV – Ultravioleta

V – *Volts*

Vh – *Volts* por hora

VDRL - *Venereal Disease Research Laboratory*

Vh – *Volts*/hora

v/v – Razão volume de soluto por volume de solvente

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Histórico	17
1.2 Patogênese	18
1.3 Epidemiologia	19
1.4 Manifestações clínicas e laboratoriais	21
1.5 Índices de atividade da doença	22
1.6 Diagnóstico	23
<u>1.6.1 Atual diagnóstico do LES</u>	23
<u>1.6.2 Novas perspectivas para o diagnóstico do LES</u>	25
1.7 Proteômica e biomarcadores	26
2 JUSTIFICATIVAS	31
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Seleção dos voluntários	34
<u>4.1.1 Critérios de inclusão</u>	35
<u>4.1.2 Critérios de exclusão</u>	35
4.2 Normas éticas	36
4.3 Estudos laboratoriais	37
<u>4.3.1 Obtenção das amostras de soro</u>	37
<u>4.3.2 Obtenção dos <i>pools</i> de amostras</u>	37
<u>4.3.3 Extração de proteínas</u>	37
<u>4.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)</u>	38
<u>4.3.5. Eletroforese bidimensional</u>	39
<u>4.3.6 Coloração dos géis e detecção dos <i>spots</i></u>	40
<u>4.3.7 Eletroforese diferencial em gel bidimensional (2D-DIGE)</u>	41
<u>4.3.8 Análise dos géis fluorescentes</u>	42
<u>4.3.9 Tratamento dos <i>spots</i>: digestão enzimática das proteínas</u>	43
<u>4.3.10 Espectrometria MALDI-TOF/TOF</u>	44
<u>4.3.11 Buscas em bases de dados</u>	45
5 RESULTADOS	47
5.1 População do estudo	47
5.2 Análise proteômica	48
<u>5.2.1 Obtenção dos extratos protéicos</u>	48
<u>5.2.2 Eletroforese bidimensional</u>	50
<u>5.2.3 Eletroforese diferencial em gel bidimensional (2D-DIGE)</u>	51
<u>5.2.4 Análise das imagens</u>	54
<u>5.2.5 Identificação das proteínas</u>	61
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÃO	84
8 PERSPECTIVAS	85
REFERÊNCIAS	86

ANEXO I: - Índice de atividade utilizado no LES, SLEDAI-2K modificado (<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>).....	99
ANEXO II: Critérios do American College of Rheumatology (ACR) para diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistêmico - 1997.....	100
ANEXO III: Critérios do <i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics</i> (SLICC) para o diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	101
ANEXO IV: Folha de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP.....	102
APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de amostras biológicas.....	104
APÊNDICE B: Proteínas identificadas por <i>spot</i>, seus gl e aumento de abundância para as comparações realizadas. C: controle; O: outras doenças autoimunes; A: LES ativo; I: LES inativo.....	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A denominação do que hoje é conhecido como Lúpus variou significativamente ao longo dos anos. Há cerca de 400 a.C, lesões de pele foram referidas pela primeira vez por Hipócrates como *herpes esthiomenos*, cuja designação incluía afecções cutâneas como tuberculose, cancro, lepra, e, potencialmente, o lúpus (DUTSCHMANN, 2006).

Séculos depois, após a queda do Império Romano, na idade média, a palavra *Lupus* foi utilizada pela primeira vez para descrever lesões de pele. O termo *Lupus*, o qual significa lobo em latim, foi atribuído por Rogerius no século XIII para descrever a “doença que rói e que come a carne” causando lesões erosivas da face com destruição da pele adjacente que se assemelhavam a mordidas de lobo (SCOFIELD & OATES, 2009). Ao final da Idade Média e durante o Renascimento, a denominação para as doenças de pele da face passou a ser *noli me tangere*, de significado “não tocar” (DUTSCHMANN, 2006).

Mais tarde, no início do século XIX, em Londres, Robert Willan e William Bateman publicaram o “Manual de Doenças de Pele”, em que doenças da pele foram classificadas de acordo com a aparência. O termo *herpes* foi concedido às doenças vesiculares e *Lupus* às doenças destrutivas e ulcerativas da face, de modo que esse abarcava o que anos depois foi classificado como lúpus eritematoso e lúpus vulgar (SCOFIELD & OATES, 2009). Devido à dificuldade em se diferenciar as classes da doença, no final no século XIX foi atribuído o nome de Lúpus Eritematoso Disseminado. Ao ser observado que a doença comprometia vários órgãos e requeria o acompanhamento por especialistas de diversas áreas da medicina, a partir da segunda metade do século XX, tal condição clínica passou a ser denominada Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES).

Hoje, sabe-se que o LES é uma doença autoimune crônica caracterizada pela presença de autoanticorpos contra antígenos nucleares e citoplasmáticos de diversos órgãos, como pele, coração, pulmões e rins. O envolvimento renal leva ao desenvolvimento de glomerulonefrite, uma séria complicação que, frequentemente, está associada a um mau prognóstico em longo prazo (BERTSIAS *et al.*, 2012).

1.2 Patogênese

O LES é um distúrbio autoimune sistêmica que resulta da perda de tolerância imunológica a auto-antígenos, levando a danos em múltiplos órgãos. Fatores genéticos, ambientais, hormonais, epigenéticos e imunorregulatórios podem atuar sequencial ou simultaneamente sobre o sistema imunológico no desenvolvimento do LES (TSOKOS, 2011).

Propõe-se que três mecanismos fundamentais estejam envolvidos no processo de desenvolvimento da autoimunidade e patogênese da doença: (1) alteração da depuração de materiais contendo ácidos nucleicos (DNA/RNA) e imunocomplexos; (2) ativação excessiva do sistema imune inato com participação dos receptores do tipo Toll (TLR's) e interferons do tipo I (IFN1); e (3) produção e ativação anormal de células B e T (LIU & DAVIDSON, 2012; SIMON, 2013).

Todas as vias podem levar a produção de interferon- α (IFN α) mediado por ácidos nucleicos endógenos. Tanto células dendríticas mieloides quanto células dendríticas plasmocitoides produzem IFN α em resposta aos auto-antígenos de ácidos nucleicos e ácidos nucleicos próprios em forma de imunocomplexos, respectivamente. IFN α apresenta muitas funções imunológicas, incluindo maturação de células B, produção de autoanticorpos e aumento da sobrevivência de células B e T ativadas. IFN α também ativa células dendríticas mieloides e contribui diretamente para o dano endotelial, acelerando o processo de aterosclerose (SQUATRITO *et al.*, 2014).

A produção de autoantígenos durante a apoptose (espontânea ou mediada por raios UV), diminuição da depuração e apresentação desregulada de antígenos dão início à resposta autoimune. Nucleossomos contendo ligantes endógenos perigosos que podem se ligar a receptores moleculares associados a agentes patogênicos são incorporados em vesículas apoptóticas promovendo a ativação de células dendríticas e de células B, levando à produção de IFN e autoanticorpos, respectivamente. Receptores da superfície celular, tais como receptores de célula B (BCR) e receptores de porção Fc como FcRIIa facilitam a endocitose de corpos contendo ácidos nucleicos ou complexos imunes e a ligação a receptores endossomais da imunidade inata, tais como TLRs com a consequente ativação de

fatores de transcrição indutores da produção de citocinas inflamatórias e de moléculas apoptóticas.

Nas fases iniciais da doença, quando os autoanticorpos e complexos imunes podem ainda não terem sido formados, peptídeos antimicrobianos liberados por tecidos danificados (como o LL37) e outras defensinas podem se ligar aos ácidos nucleicos inibindo sua degradação e, portanto, facilitando sua endocitose e a estimulação de TLR- 7/9 em células dendríticas plasmocitoides. Quantidades crescentes de ácidos nucleicos endógenos relacionados a apoptose estimulam a produção de IFN e promovem a autoimunidade ao quebrar a auto-tolerância através da ativação e promoção de maturação de células dendríticas convencionais (mieloides). Células dendríticas imaturas promovem a tolerância, ao passo que células dendríticas maduras ativadas promovem a auto-reatividade. A produção de autoanticorpos por células B no LES é impulsionada pela disponibilidade de antígenos endógenos e é, em grande parte, dependente das células T auxiliares, mediada por interações da superfície celular (CD40L/CD40) e citocinas (IL21). Além disso, complexos imunes contendo cromatina estimulam intensamente células B devido às ligações BCR/TLR (BERTSIAS *et al.*, 2012; CHOI *et al.*, 2012).

1.3 Epidemiologia

Conforme Pons-Estel *et al.* (2010), o LES tem sido relatado na América do Norte, América do Sul, Europa, África, Ásia e Austrália. Suas análises demonstram que incidência e prevalência do LES apresentam discrepâncias entre diferentes regiões do mundo e dentro de um mesmo país: entre 1975 e 2000, foi observada uma incidência que variou de 1,2 a 8,7 casos novos/ 100.000 habitantes/ ano nos países americanos; 1,0 a 31,9 casos novos/ 100.000 habitantes/ ano entre os países europeus e incidência de 11,0 casos novos/ 100.000 habitantes/ ano no único estudo realizado na Oceania. Nos estudos de prevalência, os países das Américas apresentaram uma variação de 42-130 casos/ 100.000 habitantes; países europeus 7-207 e Oceania 18-93 casos/ 100.000 habitantes.

Estudos epidemiológicos no Brasil ainda são escassos, tendo sido realizados apenas nos estados Rio Grande do Norte (RN) e Paraná (PR). A cidade de Natal-RN

apresenta uma incidência de LES de 8,7 casos novos/100.000 habitantes/ ano, conforme estudo realizado no ano 2000, em que a média de idade de novos casos foi de 31,8 anos (PEREIRA VILAR & SATO, 2002). Estudo realizado em Cascavel-PR através de revisão de prontuários médicos entre 2007 e 2008 revelou incidência estimada de 4,8 casos a cada 100.000 habitantes/ano e idade média de diagnóstico de 41,5 anos (NAKASHIMA *et al.*, 2011).

Em estudos epidemiológicos, geralmente, as taxas de incidência são declaradas no total da população e representam valores médios entre os sexos; no entanto, sabe-se que a incidência em mulheres é dez vezes maior do que nos homens (PONS-ESTEL *et al.*, 2010). Tal fato sugere que fatores hormonais e ligados ao cromossomo X interferem na patogênese da doença. Embora não haja níveis aumentados de estrógeno nas pacientes com LES, observa-se elevados níveis dos seus metabólitos, como a 16-alfa-hidroxiesterona e estriol (SIMON, 2013). Recentemente, tem-se sugerido que o cromossomo X contribui, independente de fatores hormonais, para o agravamento do LES, pois camundongos fêmeas e machos castrados, geneticamente manipulados para expressar as combinações XX, XO (fêmeas), XY ou XXY (machos), apresentaram diferentes respostas ao lúpus induzido. A presença de dois cromossomos X aumentou a gravidade da doença (SMITH-BOUVIER *et al.*, 2008).

Outros diversos fatores são correlacionados ao acúmulo de danos no LES. Vários autores postulam que fatores genéticos, etnia, idade, condição socioeconômica e exposição a fatores ambientais, como raios ultravioletas, influenciam a epidemiologia da doença (ALARCÓN *et al.*, 2002; PEREIRA VILAR & SATO, 2002; NAKASHIMA *et al.*, 2011).

Um estudo de coorte denominado PROFILE foi realizado com diferentes grupos de quatro centros e diferentes regiões dos Estados Unidos da América (EUA), a fim de comparar as manifestações clínicas prevalentes em cada grupo e consequentemente criar um perfil de fenótipos de cada região. Como resultado, verificou-se que caucasianos têm a menor taxa de envolvimento renal e citopenia, porém com a maior taxa de fotossensibilidade e erupção malar; por outro lado, afro-americanos apresentam elevada prevalência de *rash* discoide e hispânicos têm o mais alto índice de envolvimento renal (ALARCÓN *et al.*, 2002).

1.4 Manifestações clínicas e laboratoriais

O LES é uma desordem autoimune sistêmica com amplo espectro de apresentações clínicas, que abrangem quase todos os órgãos e tecidos. A doença pode se manifestar através de *rash* malar, *rash* discoide, fotossensibilidade, úlceras orais, artrite, serosite, nefrite e distúrbios neurológicos, hematológicos ou imunológicos. Para caracterizar a presença de LES, no mínimo quatro dessas manifestações devem estar presentes (HOCHBERG, 1997).

Recente estudo de coorte realizado no sul da China com 552 portadores de LES revelou como principais manifestações clínicas: artrite (61,6% dos casos), *rash* malar (52,7%), fotossensibilidade (22,8%), úlceras mucosas (17,0%) e lesões discoides (14,7%). Dentre as manifestações hematológicas, a mais comum foi anemia (63,8%), seguida por leucopenia (29,0%) e trombocitopenia (14,9%). Pleurite e pericardite foram observadas em 18,3% e 15,6% dos pacientes, respectivamente. Biópsia renal revelou 46,7% de prevalência de nefrite, ao passo em que manifestações neuropsiquiátricas estavam presentes em 4,9% dos indivíduos (LI *et al.*, 2015).

Nos EUA, 35% dos adultos com LES apresentam evidência clínica de nefrite no momento do diagnóstico e cerca de 50-60% desenvolvem nefrite durante os 10 primeiros anos da doença, fazendo com que essa seja a manifestação mais relevante (DOOLEY *et al.*, 2004). Biópsias renais desses pacientes revelaram um amplo espectro de alterações morfológicas que compreende lesões vasculares, glomerulares e tubulointersticiais (WEENING *et al.*, 2004; HAHN *et al.*, 2012).

No Brasil, assim como em outros países tropicais, as lesões cutâneas (fotossensibilidade, *rash* malar, *rash* discoide e alopecia) são as manifestações mais frequentes: compreendem 90,2% das manifestações observadas em pacientes de Natal-RN e 93,3% nos pacientes de Belém-PA (SAUMA *et al.*, 2004; BEZERRA *et al.*, 2005; NAKASHIMA *et al.*, 2011).

Um recente estudo retrospectivo realizado no sul do Brasil com 460 pacientes de um centro terciário de reumatologia revelou como manifestações hematológicas mais prevalentes a leucopenia (30% dos casos), seguida por trombocitopenia (21%), linfopenia (18%) e anemia hemolítica (8%). Como dados adicionais, observou-se

grande prevalência das manifestações cutâneas, com presença de fotossensibilidade em 76,7% dos pacientes, *rash* malar em 52,7%, úlceras orais em 46,9% e *rash* discoide em 15,1%. Artrites estavam presentes em 61,3% dos casos, enquanto glomerulonefrites em 40,0%. O achado menos prevalente foi psicose, presente em apenas 5% da população analisada (SKARE *et al.*, 2015).

1.5 Índices de atividade da doença

O LES cursa com períodos de atividade e remissão. Nesse contexto, índices de atividade foram criados com o objetivo de padronizar a avaliação de sua atividade. Alguns índices propostos na literatura são fáceis de serem realizados, o que permite sua utilização na prática clínica de rotina, fornecendo informações rápidas acerca do estado do paciente. Além disso, constituem excelentes ferramentas para guiar decisões terapêuticas (Ceccarelli *et al.*, 2015).

Os principais índices atualmente disponíveis são o *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI), *European Consensus Lupus Activity Measure* (ECLAM), *Systemic Lupus Activity Measure Revised* (SLAM-R) e *British Isles Lupus Assessment Group* (BILAG). Já avaliação de severidade de *flares* pode ser realizada através do *SELENA Flare Index* (SFI) ou *BILAG-2004 Flare Index*, os quais permitem classificar a atividade em branda, moderada ou severa (THANOU & MERRILL, 2013).

A avaliação do LES para medida da atividade, melhora, agravamento ou *flare* pode ser feita por diferentes critérios, gerando impacto significativo na interpretação de resultados de estudos clínicos e epidemiológicos. Para se evitar vieses em estudos de comparação, torna-se importante a revisão crítica de trabalhos que utilizaram diferentes ferramentas (PETRI, 2002; THANOU & MERRILL, 2013).

O SLEDAI foi desenvolvido em 1985 em Toronto por um grupo de expertises em LES (BOMBARDIER *et al.*, 1992) e tem sido extensamente utilizado por fornecer bons resultados quanto à validade, reprodutibilidade e acurácia na avaliação longitudinal de pacientes (SUZUKI *et al.*, 2009; BADOT *et al.*, 2012; SOMPARN *et al.*, 2012; INÊS *et al.*, 2013; RAO *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2013). Através de escores, esse índice avalia a atividade da doença com relação aos últimos 10 dias

incluindo 24 parâmetros clínicos e laboratoriais e levando-se em conta o acometimento de diferentes órgãos (ANEXO I). Variação de três pontos entre uma visita e outra é aceita como ativação da doença e variações maiores ou iguais a 12 pontos significam atividade grave (YEE *et al.*, 2009; FREIRE *et al.*, 2011; BERTSIAS *et al.*, 2012).

No ano de 2000, o grupo de Toronto revisou o SLEDAI original dando origem ao índice SLEDAI-2K, o qual permite mensurar a atividade da doença para importantes manifestações clínicas, como proteinúria, erupções cutâneas, alopecia e úlceras de mucosa (GLADMAN *et al.*, 2002). Em 2004, Uribe *et al.*, realizaram estudo comparativo entre SLAM-modificado, SLEDAI mexicano e um SLEDAI-2K modificado comparando-os com o SLEDAI-2K e verificaram que o SLEDAI-2K modificado teve a melhor capacidade de distinguir pacientes claramente ativos daqueles inativos ou com atividade mínima e o menor custo entre os três instrumentos avaliados. O SLEDAI 2K-modificado não considera os parâmetros sorológicos: anti-dsDNA e complemento sérico (ANEXO I).

1.6 Diagnóstico

1.6.1 Atual diagnóstico do LES

A natureza dinâmica da doença muitas vezes torna o seu diagnóstico um desafio, exigindo uma complexa interação entre medicina contemporânea, pacientes e médicos (PRICE & WALKER, 2013). Durante o curso da doença, múltiplos órgãos e tecidos vitais podem estar acometidos. Atualmente, conforme recomendações do American College of Rheumatology (ACR), quatro de 11 critérios devem estar presentes, em série ou simultaneamente, durante qualquer intervalo de observação, para que seja feito o diagnóstico de LES. Os critérios foram propostos pela primeira vez em 1971 e revisados em 1982 e 1997 (ANEXO II), sendo que a primeira revisão foi validada, mas a segunda não (ACR, 2013; SIMON, 2013; GLADMAN & UROWITZ, 1999; HOCHBERG, 1997; TAN *et al.*, 1982).

Como quatro dos 11 critérios são manifestações de pele ou mucosas (incluindo fotossensibilidade), o diagnóstico da doença pode ser feito apenas com base em sintomas cutâneos, acarretando o não rastreamento de lesões em órgãos internos,

como rins e cérebro e, conseqüentemente, o agravamento do quadro clínico do paciente (TSOKOS, 2011).

Conforme analisado por Petri & Magder (2004) e Petri (2005) os critérios do ACR possuem algumas limitações como duplicação de sinais de lúpus cutâneo (fotossensibilidade e *rash* malar), não inclusão de outras manifestações cutâneas (erupção maculopapular ou policíclica) dentre outras.

Neste contexto, grandes esforços foram destinados a aperfeiçoar esses critérios. Diversos grupos de pesquisa em LES se reuniram e formaram o *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC), o qual revisou e validou os critérios de classificação do LES de acordo com o ACR, a fim de melhorar a relevância clínica, atender a critérios metodológicos rigorosos e incorporar novos conhecimentos sobre a imunologia do LES. Após a validação, foram identificados 17 critérios (ANEXO III), dos quais pelos menos quatro deverão estar presentes para que a doença seja classificada como LES. Dos quatro critérios pelo menos um deve ser clínico e um imunológico ou o indivíduo deverá ter nefrite lúpica confirmada por biópsia na presença de ANA's ou anti-dsDNA (PETRI *et al.*, 2012, HAHN *et al.*, 2012).

Esse novo critério é simples, completo e mais sensível do que a classificação atualmente usada e está validado para utilização em pesquisas e diagnóstico da doença. No entanto, os critérios SLICC são menos específicos quando comparados aos critérios ACR (PETRI *et al.*, 2012). Dessa forma, critérios ACR continuam sendo a forma mais extensamente utilizada para diagnóstico do LES.

Além dos critérios laboratoriais propostos pelo ACR, como as manifestações renais, hematológicas e imunológicas, incluindo o FAN-Hep2, diversos outros exames laboratoriais são rotineiramente utilizados como complementares ao diagnóstico do LES. Isso se deve ao fato da inespecificidade dos critérios ACR não fornecer segurança para conclusão do diagnóstico. O fracionamento do FAN-Hep2 e a pesquisa de auto-anticorpos específicos para a positividade observada contribui para melhor caracterização imunológica do quadro. O diagnóstico diferencial pode requerer a pesquisa de anticorpos anti-ribonucleoproteínas (anti-RNP), anti-citoplasma de neutrófilos (p-ANCA e c-ANCA), anti-SSA/Ro e anti-SSB/La. Outros exames como pesquisa de crioglobulinas, dosagem de complemento sérico (C3 e

C4) e fator reumatoide são úteis para melhor elucidação. Pacientes com suspeita de nefrite lúpica devem ser submetidos à biópsia renal para diagnóstico confirmatório e classificação da glomerulonefrite (WEENING *et al.*, 2004).

1.6.2 Novas perspectivas para o diagnóstico

Embora os critérios diagnósticos pareçam relativamente simples, na prática a simplicidade está longe de ser alcançada, pois o LES apresenta uma gama de sinais e sintomas semelhantes aos de outras doenças autoimunes, em especial às doenças inflamatórias do tecido conjuntivo como pleurite, serosite, pericardite e vasculite (GOLDBLATT & O'NEILL, 2013).

Os distúrbios autoimunes do tecido conjuntivo incluem artrite reumatoide, LES, Síndrome de Sjögren primário, esclerose sistêmica, miosite inflamatória idiopática e as vasculites sistêmicas e se caracterizam principalmente, mas não exclusivamente, por acometimentos de articulações e músculos. Uma vez que doenças reumáticas autoimunes compartilham diversas características imunológicas e manifestações clínicas, o diagnóstico diferencial precoce é essencial para se garantir a terapêutica adequada e para melhor definição do prognóstico (GOLDBLATT & O'NEILL, 2013).

A heterogeneidade da doença e complexidade do diagnóstico tem impulsionado pesquisadores a desenvolverem estudos mais aprofundados que permitam definir novas estratégias de diagnóstico, que sejam mais específicos, objetivos e menos invasivos que os métodos atualmente disponíveis (MOSLEY *et al.*, 2006; AHEARN *et al.*, 2012).

Nesse cenário, a metabolômica consiste uma nova ferramenta que pode ser útil na construção de um perfil metabólico completo e específico do LES, permitindo a realização de estudos para se definir possíveis candidatos a biomarcadores para fins de diagnóstico e prognóstico da doença (PRIORI *et al.*, 2013). Nos estudos de Oyang *et al.* (2011) pacientes com LES apresentaram significativas alterações metabólicas, revelando que, além de alterações imunológicas, a doença acarreta mudanças no perfil do metabolismo energético, de aminoácidos, lipídeos e purinas. Estudos nesse campo ainda são escassos.

Em contrapartida, a proteômica tem se destacado, nos últimos anos, como

importante ferramenta para identificar biomarcadores em amostras biológicas, os quais possibilitem o desenvolvimento de métodos de diagnóstico de doenças autoimunes, em especial o LES. Além disso, pode exercer um papel crucial no mapeamento do perfil proteico entre diferentes grupos de estudo (indivíduos saudáveis, portadores de LES, nefrite lúpica e outras doenças autoimunes) (KNEPPER, 2002; OATES *et al.*, 2005; ROVIN *et al.*, 2005; MOSLEY *et al.*, 2006; ROVIN *et al.*, 2007; VARGHESE *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2008; WU & MOHAN, 2009; HUANG *et al.*, 2009; SOMPARN *et al.*, 2012; RANA *et al.*, 2012).

1.7 Proteômica e biomarcadores

O termo “proteoma” foi usado pela primeira vez em 1994 por Wilkins *et al.* (1996) para se referir ao conjunto de PROTEÍNAS codificadas pelo genOMA. Proteômica, por sua vez, é definida como uma análise sistemática de proteínas a fim de se determinar suas identidades, quantidades, funções e interações (PENG & GYGI, 2001). Nos últimos anos, análises proteômicas de diversos fluidos biológicos especialmente soro, plasma e urina têm sido realizadas com sucesso na busca por biomarcadores (ROVIN *et al.*, 2005; RANA *et al.*, 2012; BADOT *et al.*, 2013, ZHOU *et al.*, 2013).

De acordo com o *National Institute of Health* (NIH), um biomarcador é considerado “uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processo biológico normal, processo patogênico ou resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica” (JENKINS *et al.*, 2011).

A vasta utilização de soro como possível fonte de biomarcadores se deve às características do fluido como esterilidade, proteoma relativamente estável, além de sua obtenção ser fácil, barata e de baixo risco. Alterações quantitativas ou qualitativas de proteínas podem ser correlacionadas ao estado fisiológico de tecidos em diversas situações como doenças, infecções, desnutrição entre outros (GOOD *et al.*, 2007).

O soro contém 60-80mg de proteínas/mL além de várias outras pequenas moléculas incluindo sais, lipídeos, aminoácidos e carboidratos. Os constituintes proteicos mais abundantes do soro incluem albumina, imunoglobulinas, transferrinas, haptoglobinas

e lipoproteínas (BURTIS *et al.*, 2008). Além dessas, também contêm muitas outras proteínas que são sintetizadas e secretadas ou extravasadas de células e tecidos de todo o corpo. Estima-se que mais de 10.000 proteínas estejam fisiologicamente presentes no soro, a maioria das quais em baixas concentrações (ADKINS *et al.*, 2002). Muitas proteínas candidatas a biomarcadores de importância clínica estão presentes no plasma ou soro a níveis de pg/mL e ng/mL (SHI *et al.*, 2013).

No processo de descoberta de um biomarcador para uso clínico, alguns passos são imprescindíveis para garantir a qualidade do estudo, dentre os quais se destacam a definição clara da pergunta clínica; obtenção de protocolo para amostragem e preparo da amostra, de forma a minimizar as inevitáveis variações biológicas; realização das análises em plataformas tecnológicas de alto rendimento e elevada reprodutibilidade; análise estatística adequada associada à pergunta clínica; validação do potencial biomarcador através de avaliações em diversos grupos de pacientes preferencialmente de um multicentro, execução de amostras cegas e, por fim, sequenciamento da molécula (GOOD *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2010).

Estudos são constantemente realizados a fim de definir um padrão de processamento de amostras que garanta a melhor recuperação possível das proteínas totais. Atualmente, têm sido preconizadas diversas metodologias, como a extração proteica por meio de precipitação com solventes orgânicos, filtração centrífuga, liofilização, ultracentrifugação e *kits* comercialmente disponíveis que associam dois ou mais desses métodos (KHAN & PACKE, 2006; THONGBOONKERD *et al.*, 2006; MISCHAK *et al.*, 2010, RANA *et al.*, 2012).

Após obtenção do extrato proteico, uma técnica que pode ser utilizada para obter o proteoma da amostra é a eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE), metodologia descrita primeiramente por O'Farrell (1975) e que, desde então, vem sendo constantemente aprimorada. Essa técnica constitui uma ferramenta poderosa para separar proteínas provenientes de misturas complexas como células, tecidos e fluidos biológicos. Sua metodologia consiste na separação de proteínas em duas etapas, através de duas de suas propriedades físico-químicas: o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular (MM). A eletroforese bidimensional é um método de separação extremamente sensível, reprodutível e de elevada resolução. Sua grande utilidade consiste no fato de que, além de fornecer informações sobre pI e MM das

proteínas presentes na amostra, informa também sobre a expressão, abundância relativa e modificações pós-traducionais, verificadas pela alteração da mobilidade eletroforética (O'FARRELL, 1975; PANDEY & MANN, 2000).

A primeira dimensão consiste na focalização isoeétrica (*Isoelectric focusing* – IEF), em que há separação das proteínas de acordo com seu ponto isoeétrico (pI). Em fitas (*strips*) de plástico de gradientes de pH imobilizados, disponíveis comercialmente (*Immobilised pH Gradients* – IPG), as proteínas carregadas movem-se até o seu pI, onde possuem carga nula (RABILLOUD & LELONG, 2011; GE-Healthcare, 2012).

A segunda dimensão se baseia na eletroforese em gel de poliácridamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) para a separação das proteínas de acordo com sua MM. O SDS é um detergente aniônico que interage com as cadeias peptídicas das proteínas, levando à desnaturação proteica e à formação de um complexo de SDS-proteína, carregado negativamente. Ao aplicar a corrente elétrica, todas as proteínas, então com a mesma carga, migram em direção ao eletrodo positivo e são separadas somente pelas diferenças entre as suas massas moleculares (O'FARRELL, 1975; RABILLOUD & LELONG, 2011).

O perfil obtido após a separação eletroforética das proteínas pode ser facilmente visualizado através de diferentes métodos de coloração, sendo os mais populares, práticos e baratos o *Coomassie brilliant blue* e a impregnação por nitrato de prata. Após a coloração, obtém-se um perfil proteico em que cada *spot* corresponde a uma ou a algumas proteínas, facilitando a posterior análise por espectrometria de massa (O'FARRELL, 1975, KHAN & PACKE, 2006; THONGBOONKERD *et al.*, 2006, RABILLOUD & LELONG, 2011).

Desde o seu surgimento, a técnica de 2D-PAGE sofreu diversos avanços que possibilitaram a análise proteômica quantitativa, assim como melhorias na resolução e reprodutibilidade dos géis. A utilização de corantes fluorescentes nesse tipo de método tem crescido bastante após o desenvolvimento da técnica de eletroforese diferencial em gel bidimensional (*Two-dimensional differential gel electrophoresis* – 2D-DIGE) (HEYWOOD *et al.*, 2011; SRIVASTAVA *et al.*, 2012; AMIN *et al.*, 2014; DUTTA *et al.*, 2015). Essa técnica inovadora, desenvolvida por Unlu *et al.* (1997), possi-

bilita o processamento e comparação de três amostras em um único gel através da marcação das proteínas com três diferentes fluoróforos (Cy2, Cy3 e Cy5), aumentando a sensibilidade e reprodutibilidade dos experimentos. A abundância relativa de uma proteína entre duas ou mais amostras pode ser medida através da comparação da quantidade de fluorescência emitida por cada corante para cada *spot* (MOROUGA *et al.*, 2005).

O próximo passo no processo de identificação de um biomarcador consiste na identificação das proteínas separadas na eletroforese bidimensional através de tecnologias como espectrometria de massas. Após excisão dos *spots* selecionados entre os grupos de comparação, os mesmos são digeridos por tripsina para a extração das proteínas do gel, originando fragmentos peptídicos de MM estimadas que são submetidos à espectrometria de massa (KNEPPER, 2002; GÖRG *et al.*, 2007; RABILLOUD & LELONG, 2011, SOMPARN *et al.*, 2012).

O espectrômetro de massas pode ser composto de vários módulos: fonte de ionização, um ou mais analisadores de massas que medem a razão massa/carga (m/z) dos peptídeos ionizados e detector, o qual registra o número de íons de cada valor de m/z . Uma das combinações ionizador-analisador mais utilizadas em proteômica, atualmente, é o MALDI-ToF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-of-Flight*) ou MALDI-ToF-ToF, que possui dois analisadores *Time-of-light* (ToF). Trabalhos de análise do proteoma de pacientes com LES, nefrite lúpica ou outras doenças autoimunes reportam o uso dessa tecnologia como ferramenta eficiente na identificação de potenciais biomarcadores (SUN *et al.*, 2011; RANA *et al.*, 2012; SOMPARN *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2013; AMIN *et al.*, 2014).

O conjunto das massas moleculares dos peptídeos determinado por esta técnica corresponde à impressão digital da proteína, comumente denominado *peptide mass fingerprint* (PMF) (GÖRG *et al.*, 2007). A proteína é, em seguida, identificada por comparação da impressão digital de massa experimental com massas peptídicas teóricas geradas utilizando bases de dados de proteínas e da sequência de nucleotídeos. Essa abordagem possui boa utilidade desde que a proteína tenha sua sequência depositada em bancos de dados, como o NCBIInr, no qual as buscas podem ser realizadas utilizando algoritmos computacionais, como o *MASCOT* (PERKINS *et al.*, 1999; RANA *et al.*, 2012; SOMPARN *et al.*, 2012).

Após a etapa de identificação, é possível construir o perfil de proteínas que possuem abundância aumentada ou diminuída em cada uma das condições analisadas. Em geral, a pesquisa por um biomarcador envolve uma fase de descoberta e outra de validação antes de ser utilizado para o desenvolvimento de ensaio clínico. A fase de descoberta envolve uma abordagem exploratória, que exige a identificação confiável dos marcadores candidatos cujo nível de abundância seja estatisticamente relevante a uma determinada condição clínica. Esses candidatos requerem validação usando uma amostragem mais representativa da população alvo, a fim de se avaliar a reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade (DRUCKER & KRAPPENBAUER, 2013).

2 JUSTIFICATIVAS

O LES é uma doença autoimune crônica caracterizada pela presença de autoanticorpos contra antígenos nucleares e citoplasmáticos de diversos órgãos, como pele, coração, pulmões e rins. Pode se manifestar através de *rash* malar, *rash* discoide, fotossensibilidade, úlceras orais, artrite, serosite, nefrite e distúrbios neurológicos, hematológicos ou imunológicos. A desregulação imune resulta em uma síndrome com envolvimento de múltiplos órgãos e de curso difícil de ser previsto. A heterogeneidade da doença e complexidade do diagnóstico tem motivado o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico, a fim de que se torne mais específico, objetivo e menos invasivo que os métodos atualmente disponíveis.

Há uma necessidade urgente de desenvolver biomarcadores específicos do LES por várias razões. Primeiro, porque o LES pode ser incorretamente diagnosticado, até mesmo por reumatologistas experientes. O diagnóstico atual exige a interpretação dos complexos critérios desenvolvidos pelo *American College of Rheumatology*, uma vez que nenhum teste é suficientemente sensível e específico para um diagnóstico preciso. Em segundo lugar, o curso do LES é caracterizado por períodos de ativação e remissão imprevisíveis. Novamente, não há nenhum exame laboratorial confiável capaz de identificar ou prever o início ou fim de uma ativação. Em terceiro lugar, a falta de biomarcadores tem dificultado a avaliação da eficácia de novos fármacos em ensaios clínicos. Indústrias farmacêuticas com fármacos potencialmente capazes de tratar o LES permanecem relutantes em investir em ensaios clínicos, pois a resposta ao tratamento não pode ser determinada com a confiança necessária. Por fim, cada paciente tende a desenvolver diferentes manifestações e, atualmente, ainda não existem testes capazes de identificar o risco de envolvimento de órgãos específicos ou eventos potencialmente fatais, como acidentes vasculares.

A crescente necessidade de métodos de diagnóstico mais precisos, aliado ao fato do sangue ser capaz de refletir o estado fisiopatológico do organismo, levam à proposta de mapear o proteoma sérico de indivíduos portadores de LES como forma de identificar potenciais biomarcadores do LES nas suas formas ativa e inativa, os quais se-

jam capazes de distinguir laboratorialmente o LES de outras doenças autoimunes semelhantes.

Nesse contexto, análise proteômica comparativa do soro de indivíduos saudáveis, portadores de LES (ativo e inativo) e outras doenças autoimunes utilizando a tecnologia 2D-DIGE associada ao espectrômetro de massas do tipo MALDI-ToF/ToF seguido de consultas em bases de dados de peptídeos contribuem enormemente na seleção de candidatos a biomarcadores, pois possibilita construir um perfil de proteínas que apresentam alterações na sua abundância em cada uma das condições clínicas do LES. Os resultados obtidos podem subsidiar futuros desenvolvimentos de imunoenaios como ELISA e testes imunocromatográficos, sendo importantes não apenas para diagnóstico e definição de prognóstico, mas também para o monitoramento de medidas terapêuticas e melhor entendimento sobre a fisiopatologia dessa doença tão complexa.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar potenciais biomarcadores do LES através de abordagem proteômica.

3.2 Objetivos específicos

Comparar o perfil proteômico do soro de pacientes com LES ativo, LES inativo, outras doenças autoimunes semelhantes ao LES e de indivíduos saudáveis utilizando 2D-DIGE.

Selecionar e identificar proteínas diferencialmente abundantes entre LES ativo, LES inativo, outras doenças autoimunes semelhantes ao LES e grupo controle.

Determinar candidatos a biomarcadores do LES ativo e LES inativo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos voluntários

Pacientes deste estudo foram recrutados no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte e no Centro Metropolitano de Especialidades Médicas (CEM) da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte sob supervisão de médicos reumatologistas. Mulheres com diagnóstico de LES conforme critérios do American College of Rheumatology (ACR), em acompanhamento nesses centros de saúde, tiveram o *score* SLEDAI-2K modificado calculado pelo médico no momento da consulta. Pacientes portadoras de outras doenças autoimunes clínica e laboratorialmente semelhantes ao LES, diagnosticadas conforme critérios específicos para cada doença, também foram recrutadas. Indivíduos do sexo feminino, sem LES ou outra doença autoimune, em evidência, também foram recrutadas aleatoriamente para compor o grupo controle. A seleção dos participantes ocorreu de fevereiro de 2013 a janeiro de 2015. Todos os voluntários foram esclarecidos da natureza do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (APÊNDICE A), autorizando a coleta de sangue e o uso de informações constantes do prontuário médico. Os participantes foram distribuídos nos seguintes grupos:

- Grupo 1: voluntários com LES ativo, com ou sem acometimento renal, em tratamento ou não, *score* SLEDAI-2K modificado superior a 4, n=15;
- Grupo 2: voluntários com LES inativo, com ou sem acometimento renal, em tratamento ou não, *score* SLEDAI-2K modificado inferior ou igual a 4, n=15;
- Grupo 3: voluntários sem LES ou qualquer doença autoimune, sem relato de histórico familiar (controle), n= 15;
- Grupo 4: voluntários sem LES, mas com alguma doença autoimune clínica e laboratorialmente semelhante ao LES, n=15, constituído por:
 - Artrite Reumatoide (n=5),
 - Síndrome de Sjögren primário (n=2),
 - Dermatomiosite (n=2),
 - Arterite de Takayasu (n=2),
 - Esclerodermia (n=1),
 - Polimiosite (n=1),

- Síndrome do Anticorpo Anti-Fosfolípidos (SAAF) primário (n=1)
- Vasculite de pequenos vasos (n=1)

A comparação das médias de idade dos indivíduos de cada grupo foi realizada pelo Teste de Tukey.

4.1.1 Critérios de inclusão

4.1.1.1 Critérios de inclusão para grupos LES ativo e LES inativo

- Indivíduo do sexo feminino, com idade entre 18 e 70 anos;
- Diagnóstico de LES conforme ACR;
- Presença ou ausência de nefrite lúpica;
- Pacientes em tratamento ou não;
- Assinatura do TCLE pelo paciente ou responsável legal.

4.1.1.2 Critérios de inclusão para grupo de outras doenças autoimunes

- Indivíduo do sexo feminino, com idade entre 18 e 70 anos;
- Presença de doença autoimune primária e exclusiva, diagnosticada conforme critérios específicos para cada uma;
- Pacientes em tratamento ou não;
- Assinatura do TCLE pelo paciente ou responsável legal.

4.1.1.3 Critérios de inclusão para grupo controle

- Indivíduo do sexo feminino, com idade entre 18 e 70 anos;
- Ausência de doença infecciosa ou autoimune em evidência no momento da coleta ou com sintomas nos 30 dias precedentes;
- Ausência de relato de histórico familiar de doenças autoimunes;
- Assinatura do TCLE pelo paciente ou responsável legal.

4.1.2 Critérios de exclusão

4.1.2.1 Critérios de exclusão para grupos LES ativo e LES inativo

- HIV soropositivo;
- Gestantes;
- Pacientes com outros quadros patológicos associados de caráter infeccioso ou autoimune, em evidência no momento do recrutamento ou nos 30 dias precedentes;
- Recusa em assinar o TCLE.

4.1.2.2 Critérios de exclusão para grupo de outras doenças autoimunes

- HIV soropositivo;
- Gestantes;
- Pacientes com outros quadros patológicos associados de caráter infeccioso ou autoimune, em evidência no momento do recrutamento ou nos 30 dias precedentes;
- Paciente com LES associado;
- Recusa em assinar o TCLE.

4.1.2.3 Critérios de exclusão para grupo controle

- HIV soropositivo;
- Gestantes;
- Indivíduos com qualquer quadro patológico em evidência no momento da coleta ou nos 30 dias antecedentes;
- Indivíduos com LES ou outra doença autoimune;
- Recusa em assinar o TCLE.

4.2 Normas éticas

O presente estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG–COEP/UFMG sob número de protocolo 01928412.8.0000.5149 (ANEXO IV).

4.3 Estudos laboratoriais

A parte experimental do trabalho foi realizada no Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Farmácia/UFMG e no Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UFMG.

4.3.1 Obtenção das amostras de soro

Foram coletados 10 mL de sangue por punção venosa em fossa antecubital em tubos estéreis do sistema Vacuette® do Brasil, sem anticoagulante, devidamente identificados. Para obtenção dos soros, as amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos em centrífuga para tubos refrigerada a 4° C. Imediatamente após, os soros foram separados em alíquotas (100µL) em microtubos estéreis e devidamente identificados, os quais ficaram armazenados a -80° C até o momento do uso.

4.3.2 Obtenção dos *pools* de amostras

Para tornar viável a análise proteômica, foi necessário reduzir o número de amostras, assim, para garantir que cada grupo tivesse a representação das variações dos indivíduos que o compunham, as amostras de soro dos voluntários de cada grupo foram agrupadas em *pools*. Para isso, 100 µL de cada uma das 15 amostras constituintes de cada grupo foram misturados em tubo estéril da seguinte forma:

Tubo 1: *Pool A* → 100uL de cada amostra do grupo 1 (n=15)

Tubo 2: *Pool I* → 100uL de cada amostra do grupo 2 (n=15)

Tubo 3: *Pool C* → 100uL de cada amostra do grupo 3 (n=15)

Tubo 4: *Pool O* → 100 uL de cada amostra do grupo 4 (n=15)

4.3.3 Extração de proteínas

O extrato proteico de 150 µL de cada amostra foi obtido utilizando-se o *2D-Clean-Up Kit*® (GE-Healthcare) conforme instruções do fabricante. O método se baseia no uso de soluções precipitante e co-precipitante para, quantitativamente, precipitar proteínas e, simultaneamente, remover substâncias que interferem no processo de

IEF tais como detergentes, sais, lipídeos, fenóis e ácidos nucleicos. O *2D-Clean-Up Kit*® também aumenta a eficiência de marcação proteica quando se utiliza *2D DIGE*® (GE – Healthcare, 2010).

O precipitado obtido foi ressuspenso em 500 µL de Tampão de Lise (Ureia 8M, Tiourea 2M, CHAPS 4%, Tris-Base 1M) contendo coquetel de inibidores de protease (*Protease Inhibitor Mix*® - GE Healthcare) *overnight*, à temperatura ambiente (TA) e sob agitação constante. Em seguida, a solução foi passada 10 vezes por uma agulha 0,45mm X 13mm 26G BD® para completa lise mecânica dos precipitados e centrifugada a 20000 g durante 20 minutos. O sobrenadante foi dividido em alíquotas de 10µL, 20µL, 50µL e armazenado em freezer -80°C até o momento de uso. Posteriormente, foi empregado o *2D Quanti Kit*® (GE-Healthcare), de acordo com o manual do fabricante, para determinar a quantidade de proteínas totais recuperadas em cada amostra.

4.3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

Foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS -PAGE), a fim de se verificar a qualidade do extrato proteico obtido e certificar a fidelidade da dosagem de proteínas. Para isso, tampão desnaturante (Glicerol 25%, SDS 10%, azul de bromofenol 1%) foi adicionado a cada amostra na proporção 1:1 (v/v), e posterior incubação em banho-maria a 95 °C por cinco minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas em SDS-PAGE 12% (solução de acrilamida/bis-acrilamida 30% (29:1), Tris 1,5 M pH 8,8, SDS 10%, persulfato de amônio 10%, TEMED) com SDS-PAGE *stack* 4% (solução de acrilamida/bis-acrilamida 30% (29:1), Tris 1,0 M pH 6,8, SDS 10%, persulfato de amônio 10%, TEMED). Em cada canaleta do gel foi aplicado o volume de amostra equivalente a 20 µg de proteínas. O padrão de Massa Molecular (MM) utilizado foi o *Protein Molecular Weight Marker* V8491 (Promega). A eletroforese teve duração aproximada de 1h40min, ocorrendo sob 80 V nos primeiros 15 minutos e 100 V no tempo restante.

Para visualização das bandas, o gel foi colocado em solução de *Coomassie Brilliant Blue* R-250 a 0,25% por uma hora, transferido para solução descorante (ácido acético 10%, metanol 45%) por 30 min e, em seguida, transferido para outra solução descorante (ácido acético 5%, metanol 10%), na qual permaneceu *overnight*. Poste-

riormente, o gel foi digitalizado no *ImageScanner™ III* (Amersham Biosciences), utilizando-se o *software Labscan™*.

4.3.5. Eletroforese bidimensional

4.3.5.1 Focalização isoeétrica (IEF) – 1ª dimensão

As proteínas foram separadas de acordo com seu ponto isoeétrico (pI) através do processo de Focalização Isoelétrica (IEF) em *strips* contendo gradiente de pH. Para avaliar a qualidade dos perfis proteicos das amostras, foram utilizadas *strips Immobilized pH Gradient®* (IPG) (GE Healthcare) de 18 cm de comprimento e gradiente de pH 4-7.

As *strips* foram submetidas à hidratação passiva utilizando-se 700µg de proteínas. Para isso, as amostras foram diluídas em Tampão IEF (Uréia 8M, Tiouréia 2M, CHAPS a 4%, Azul de Bromofenol a 0,0025%, DTT na proporção 10mg/mL) e IPG *Buffer pH 4-7®* 1% (GE Healthcare), em um volume total de 125 µL por *strip*. Para solubilização eficiente, esta solução permaneceu sob agitação à TA por uma hora. Foi utilizado um sistema apropriado para hidratação passiva, no qual, em cada canaleta, foi cuidadosamente adicionada uma amostra. As *strips*, então, foram posicionadas com a face do gel diretamente em contato com as amostras. Após 15 minutos, foi adicionado óleo mineral sobre as *strips*, a fim de evitar o ressecamento das mesmas durante as 12 horas em que permaneceram sob hidratação passiva. A IEF ocorreu em sequência no equipamento *EttanIPGPhor™ 3* (GE-Healthcare) a 50 µA/gel, nas seguintes condições (**Tabela 1**):

Tabela 1 - Programa de isoeletrofocalização utilizado para *strips* de 18cm, pH 4-7 processado em equipamento *EttanIPGPhor™ 3* (GE-Healthcare) a 50 µA/gel

Passo	Voltagem (V)	Tempo (h) ou Vh
1 Step	500	12:00h
2 Step	1000	01:30h
3 Grad	8000	02:00h
4 Step	8000	40000Vh
5 Grad	500	01:00h
6 Step	500	20:00h

Após a IEF e antes da segunda dimensão, as *strips* foram incubadas, por 15 minutos à TA, com o agente redutor ditioneitol (DTT) 10mg/mL em Tampão de Equilíbrio (50 mM Tris 1,5M pH 8,8, Ureia 6M, Glicerol 30% (v/v), SDS 2% e 0,001% azul de bromofenol 0,5%). Em seguida, as *strips* foram transferidas para solução contendo como agente alquilante iodoacetamida (IAA) 25mg/ mL em Tampão de Equilíbrio, também por 15 min, sob agitação suave e constante. Antes da segunda dimensão, as *strips* foram rapidamente lavadas em Tampão Tris-glicina 10% para retirada do excesso de Tampão de equilíbrio com IAA.

4.3.5.2 Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida com SDS (SDS 2D-PAGE) – 2ª dimensão

As *strips* foram cuidadosamente posicionadas sobre o SDS-PAGE 12 %, evitando-se a formação de bolhas de ar entre a *strip* e o gel. Em seguida, as mesmas foram cobertas com agarose 0,5% contendo azul de bromofenol a 0,002%. Aplicou-se 10 µL de MM *Protein Molecular Weight Marker* V8491 (Promega) por gel. Para a migração das proteínas em segunda dimensão, foi utilizado o sistema de eletroforese vertical *Ettan DALTsix Electrophoresis Unit* (GE-Healthcare) preenchido com tampão de Tris-glicina 1% na parte externa às placas e com tampão Tris-glicina 2% na parte interna, em contato direto com o gel. A corrida se procedeu a 10° C, programada da seguinte forma: 50V/gel e 25mA/gel durante 15 minutos e 50mA/gel até o término. O tempo total de corrida foi de oito horas.

4.3.6 Coloração dos géis e detecção dos spots

Após o término da corrida em segunda dimensão, o gel foi corado utilizando-se *Coomassie Brilliant Blue G-250*, conforme Neuroff (1988). Para isso, os géis foram colocados em solução fixadora por 12h [etanol 30% (v/v) e ácido fosfórico 2% (v/v)], para prevenir a mobilidade das proteínas no gel e remover os anfólitos, e, em seguida, lavados 3 vezes por 10 minutos cada, com solução de ácido fosfórico 2% (v/v). Posteriormente, foram incubados por 30 minutos em solução composta de ácido fosfórico 2% (v/v), etanol 18% (v/v), sulfato de amônio 12%, à qual foi adicionada solução de *Coomassie Brilliant Blue G-250* 4% (GE-Healthcare), em volume suficiente para uma concentração final de 0,1% de corante. Os géis permaneceram nessa so-

lução sob agitação suave até atingir o ponto final da coloração, que ocorreu após cinco dias de incubação. Após completa visualização dos *spots*, o excesso de corante foi removido com solução de etanol 20%. Os géis foram digitalizados com o *ImageScanner™ III* (Amersham Biosciences), utilizando-se o *software Labscan™*.

4.3.7 Eletroforese diferencial em gel bidimensional (2D-DIGE)

Para análise quantitativa das proteínas, o extrato proteico de cada grupo foi corado antes da 2-DE. Para isso, foi utilizado o sistema de marcação mínima com corantes fluorescentes *CyDye™* (GE-Healthcare), os quais consistem em um N-hidroxisuccinimidil éster, que reage com o grupo amino primário, tipicamente o grupo amino terminal, de cadeias laterais de lisina das proteínas.

Primeiramente, o pH das amostras foi medido e ajustado para 8,5 com HCl 0,5 mM ou NaOH 500 mM. Cada extrato proteico, referente a cada *pool* de amostras, foi marcado com diferentes corantes fluorescentes *CyDye™* (GE Healthcare), a fim de eliminar quaisquer interferências decorrentes das diferenças de intensidade entre os fluoróforos. As amostras C, O, A e I foram marcadas alternadamente com Cy3 ou Cy5 e um *pool* interno composto por quantidades equivalentes de todas as amostras foi marcado com Cy2, sendo esse o padrão interno (**Tabela 2**). A marcação das proteínas foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 2 - Esquema de marcação dos extratos proteicos com *CyDye*: As amostras dos grupos C, O, A, I foram marcadas com 3 fluoróforos *CyDye* (Cy2, Cy3 e Cy5), de modo a ocorrer a inversão da marcação com diferentes fluoróforos e também obter 3 imagens de cada grupo permitindo as análises estatísticas.

GEL	Cy2	Cy3	Cy5
1	C+O+A+I	C	O
2	C+O+A+I	O	A
3	C+O+A+I	I	C
4	C+O+A+I	A	I
5	C+O+A+I	C	I
6	C+O+A+I	A	O

Cada *CyDye* (5 nmol) foi reconstituído em 5 μL de dimetilformamida (DMF) anidra (solução estoque = 1 nmol/ μL) misturando rapidamente no *vortex* e centrifugando por 30 segundos. A solução estoque foi diluída com DMF para a concentração final de 400 pmol/ μL . À cada amostra contendo 50 μg de proteínas foram adicionados 400 pmoles (1 μL) de cada *CyDye* (Cy2, Cy3, Cy5), homogeneizou-se imediatamente no *vortex*, centrifugou-se por 30 seg e incubou-se por 30 minutos no gelo, ao abrigo da luz, para que o fluoróforo se ligasse aos resíduos de lisina das proteínas. Para interromper a reação, adicionou-se 1 μL de solução de lisina 10 mM em cada amostra, homogeneizou-se novamente no *vortex*, centrifugou-se por 30 segundos e, por fim, manteve-se no gelo por 10 minutos, ao abrigo da luz.

As amostras marcadas foram agrupadas por gel, conforme **Tabela 2**. Os processos de hidratação passiva, IEF e SDS 2D-PAGE foram realizados conforme previamente descrito, com pequenas adequações: na etapa de imobilização das *strips* nos géis para se proceder à eletroforese, foi utilizada solução contendo apenas agarose 0,5%; todas as etapas, desde hidratação até final da corrida foram realizadas ao abrigo da luz.

Após eletroforese, os géis foram digitalizados no *scanner Typhoon FLA 9000* (GE-Healthcare), utilizando os seguintes parâmetros para excitação e emissão de comprimentos de onda: Cy2 (488/520nm), Cy3 (532/580nm) e Cy5 (633/670nm).

4.3.8 Análise dos géis fluorescentes

Para análise das imagens dos géis fluorescentes foi utilizado o *DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v7.2* (GE-Healthcare), o qual é dividido em diversos módulos: *Image Loader*, *Differential In-gel Analysis (DIA)*, *Biological Variation Analysis (BVA)* e *Extended Data Analysis (EDA)*.

Inicialmente, as imagens obtidas no *scanner Typhoon FLA 9000* (GE-Healthcare) (Cy2, Cy3 e Cy5 de cada um dos seis géis) foram importadas para o banco de dados do *DeCyder™* utilizando-se o módulo *Image Loader*, onde foram ajustados o brilho e contraste para melhor visualização dos *spots*. Em seguida, foi utilizado o módulo DIA para quantificação, co-deteção dos *spots* e normalização de seus volumes. Para a deteção, foram especificados os parâmetros inclinação, volume, área e o tamanho do pico. A fim de se eliminar artefatos erroneamente detectados

como *spot*, foi realizada edição manual das imagens e ajuste da inclinação para $\geq 0,87$ e área ≤ 350 .

Posteriormente, as imagens editadas no DIA foram exportadas para o módulo BVA, no qual foi realizado o *match*, ou seja, sobreposição das imagens, seguida por uma edição manual minuciosa para conferir e ajustar as correspondências entre o mesmo *spot* nos diferentes géis. Com o objetivo de identificar os *spots* com diferenças de intensidade entre os grupos, foram realizadas as seguintes sobreposições: A *versus* C, I *versus* C, O *versus* C, A *versus* I, A *versus* O e I *versus* O. Baseado na razão média do volume normalizado, realizou-se análises estatísticas utilizando o teste *T-Student* e *One-Way ANOVA*, de modo que todos os *spots* com $p \leq 0,05$ e *fold change* $> 1,5$ (aumento ou diminuição maior que 1,5 vezes) foram considerados diferencialmente intensos.

Os resultados obtidos foram exportados para o EDA, o qual proporciona análise estatística avançada para caracterização e classificação de amostras biológicas com base em dados de abundância proteica. Além análises univariáveis, como teste *T-Student* e análise de variância *One-Way ANOVA*, também foi realizada Análise de Padrões (*Pattern-Analysis*), a fim de reconhecer um padrão nas abundâncias das proteínas.

Os *spots* com diferenças de intensidade estatisticamente significativas entre os grupos foram selecionados e excisados dos géis para a identificação por espectrometria de massa MALDI-ToF/ToF. Para visualização dos *spots*, os géis foram corados pelo *Coomassie Brilliant Blue G-250* conforme descrito no item 4.3.6. Todas as etapas de manipulação dos géis e *spots* excisados foram realizadas sob cuidados máximos para se evitar a contaminação das amostras com queratina. Para isso, foram utilizadas luvas sem talco, jaleco de manga comprida, touca e máscara.

4.3.9 Tratamento dos *spots*: digestão enzimática das proteínas

Os *spots* excisados foram colocados em tubos siliconados de 1,5 mL, onde foram macerados para facilitar a remoção dos peptídeos do gel. O *Coomassie Brilliant Blue G-250* foi removido dos fragmentos de gel através de três lavagens de 15 minutos cada, com 400 μ L de solução de Acetonitrila 50% e Bicarbonato de Amônio 25 mM, pH 8,0 sob constante agitação. Após remoção da solução descorante, os *spots*

foram desidratados com 200 μL de Acetonitrila P.A. durante 5 minutos. O excesso dessa solução foi cuidadosamente removido e deixou-se à TA até que o solvente evaporasse completamente. Para digestão enzimática das proteínas, foi adicionado 10 μL de Tripsina (Promega, USA) a 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$, mantendo-se por 10 minutos no gelo para que a mesma penetrasse no gel. Em seguida, foram adicionados 20 μL de Bicarbonato de Amônio 50mM e as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 16 horas para a completa digestão proteica. O excesso de solução que não penetrou nos fragmentos de géis foi coletado e transferido para tubos siliconados de 600 μL novos e devidamente identificados. Ao tubo anterior, contendo os fragmentos de géis, foi adicionada solução de Ácido Fórmico 5% e Acetonitrila 50% e deixado por 30 minutos sobre constante agitação. Após esse tempo, a solução foi removida e transferida para o tubo contendo a primeira solução retirada. Essa etapa foi realizada mais uma vez, a fim de remover eficientemente os peptídeos. Os tubos contendo todos os extratos coletados foram transferidos para o equipamento *Concentrator Plus*[™] (Eppendorf, USA) para concentrar as amostras até o volume final de 10 μL . Posteriormente, os extratos foram passados em colunas *ZipTip*[®]C18 (Millipore, USA) para dessalinização e concentração dos peptídeos.

4.3.10 Espectrometria MALDI-TOF/TOF

A identificação espectrométrica dos peptídeos foi realizada no Laboratório de Toxinologia do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Os peptídeos dessalinizados foram identificados no espectrômetro de massas *AB SCIEX MALDI TOF-TOF*[™] 5800 System (Applied Biosystems, USA). O processo de calibração externa do equipamento envolveu a utilização de uma mistura de peptídeos: des-Arg1- bradiginina ($m/z = 904.468$), angiotensina I ($m/z = 1296.685$), Glu1-fibrinopeptídeo B ($m/z = 1570.677$) e hormônio adenocorticotrópico (18-39) ($m/z = 2465.199$). 0,3 μL da amostra foi solubilizado em 0,3 μL de solução saturada de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) em uma placa MTP *Anchor-CHIP*[™] 600/384 (Bruker Daltonics), onde permaneceu para secagem à TA. Os parâmetros usados para a busca foram os seguintes: sem restrição para peso molecular da proteína, um sítio de clivagem da tripsina perdido, modificações variáveis da metionina (oxidação) e da cisteína (carbamidometilação), formação de piroglutamato na extremidade N-terminal da glutamina sem outras modificações pós-traducionais.

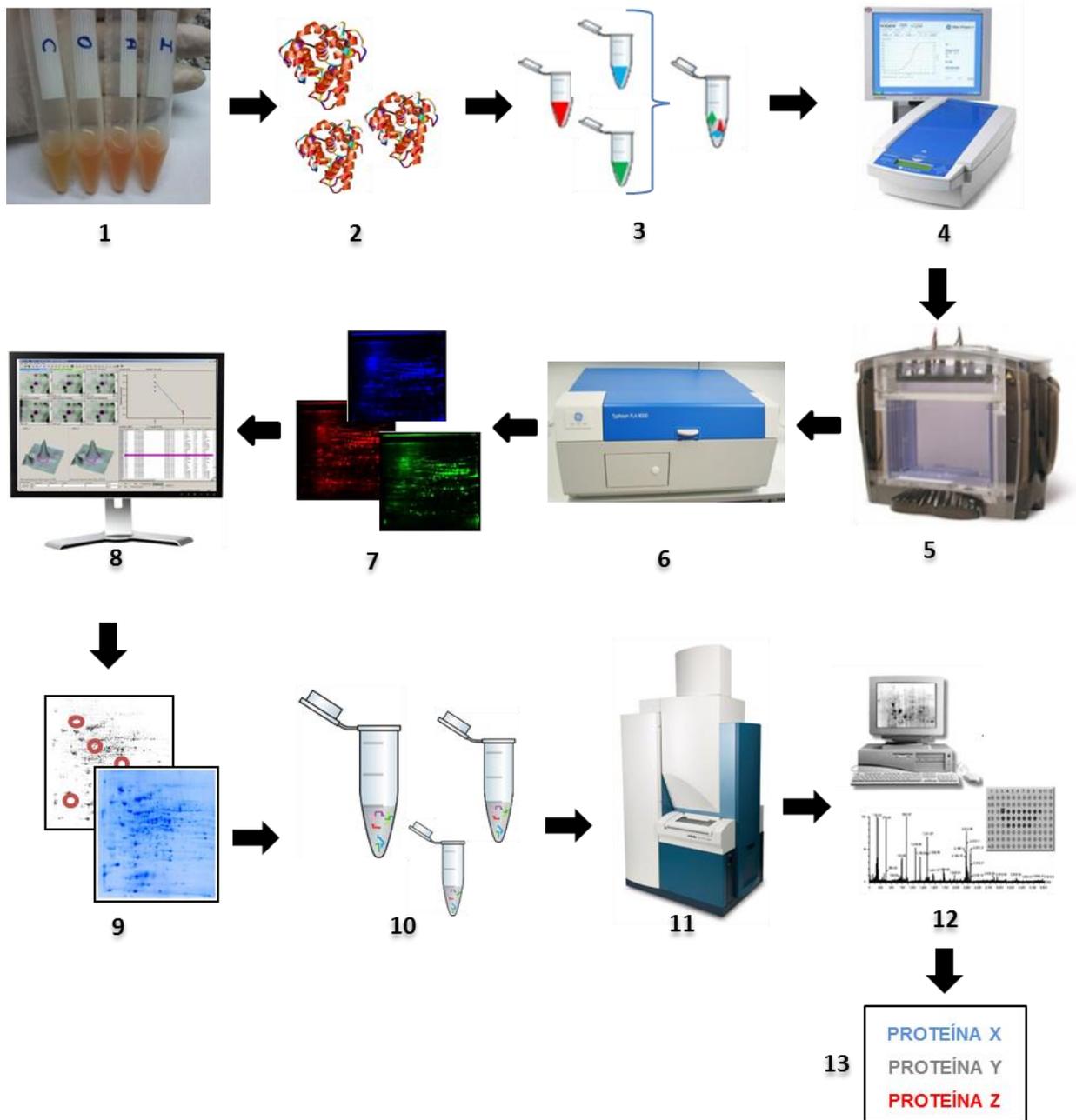
A tolerância de massa para os peptídeos nas buscas foi de 0,8 Da para espectros MS e 0,6 Da para espectros MS/MS.

4.3.11 Buscas em bases de dados

Os dados de MS e MS/MS obtidos foram submetidos ao *programa MASCOT search engine* (Matrix Science - <http://www.matrixscience.com>). As buscas foram feitas utilizando-se como banco de dados o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) restrito para *Homo sapiens*. O NCBI também foi utilizado para se obter informações sobre as proteínas identificadas, tais como tamanho em aminoácidos, gene codificador, sua localização cromossômica, proteínas idênticas, patentes depositadas e também para obter as anotações no formato FASTA. A partir da sequência FASTA, utilizou-se o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para realizar o alinhamento, por homologia, entre as sequências de aminoácidos das proteínas de interesse contra sequências aleatórias depositadas no banco de dados para *Homo Sapiens*. Foram verificados, também, os alinhamentos entre as proteínas que possuíam mesmo nome, mas *genInfo Identifier* (gi) diferentes.

Com a finalidade de facilitar o entendimento, o esquema a seguir (**Figura 1**) resume a metodologia apresentada.

Figura 1 - Esquema da metodologia utilizada para análise proteômica. Pools de amostras (1); obtenção dos extratos proteicos (2); marcação das proteínas com corantes fluorescentes (3); isoeletrofocalização (4); 2D-SDS-PAGE (5); digitalização dos géis e obtenção das imagens para análises (6 e 7); análises das imagens (8); coloração dos géis e excisão dos spots com diferenças de intensidade (9); digestão por tripsina (10); identificação espectrométrica dos peptídeos (11); buscas em bancos de dados e organização dos dados proteômicos (12); proteínas com diferentes abundâncias (13).



5 RESULTADOS

5.1 População do estudo

Pacientes com LES e outras doenças autoimunes foram recrutados no Centro de Especialidades Médicas (CEM) da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte e no Hospital Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, conforme critérios descritos no item 4.1. Todos os indivíduos assinaram o TCLE autorizando a coleta de sangue e o uso de informações constantes dos prontuários médicos. Indivíduos saudáveis (controle) foram recrutados no CEM e Faculdade de Farmácia da UFMG e selecionados após atenderem aos critérios de inclusão no estudo. A idade média dos pacientes com LES ativo foi de $32,0 \pm 10,1$ anos; para LES inativo foi de $36,5 \pm 9,4$ anos, para o grupo de outras doenças autoimunes foi de $41,8 \pm 15,4$ anos e de $32,7 \pm 7,9$ anos para grupo controle (**Figura 2**). Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de idades ($p= 0,07$ para Teste de Tukey). Critérios ACR apresentados pelas pacientes, no momento do diagnóstico, estão resumidos na **Tabela 3**.

Figura 2 - Média de idade dos indivíduos do estudo, por grupo.

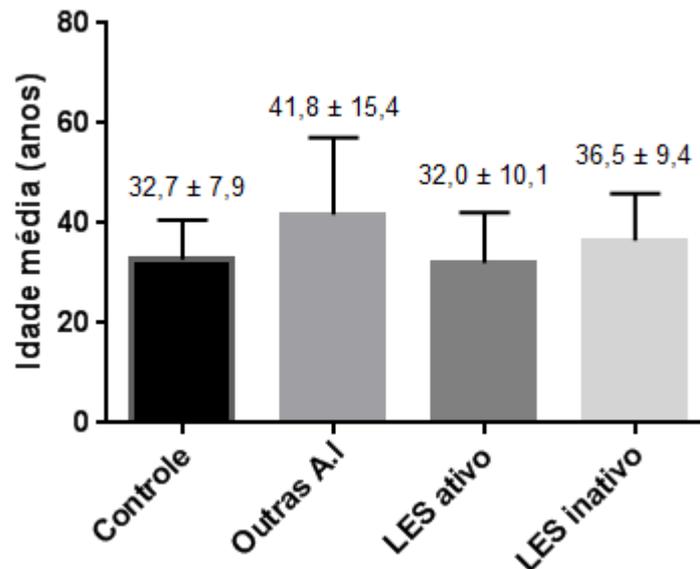


Tabela 3 - Critérios ACR apresentados pelas pacientes com LES no momento do diagnóstico. Dados obtidos após revisão de prontuários.

Critérios do LES	Número de pacientes total (%)	Pacientes LES ativo	Pacientes LES inativo
Rash malar	20 (66,7)	13	7
Rash discoide	8 (26,7)	6	2
Fotossensibilidade	15 (50,0)	8	7
Úlcera oral	10 (33,3)	5	5
Artrite	14 (46,7)	8	6
Serosite	6 (20,0)		
Pleurite	6 (20,0)	1	5*
Pericardite	1 (3,3)	0	1*
Distúrbios renais	18 (60,0)		
Proteinúria	18 (60,0)	8	10
Cilindros celulares	0 (0,0)	0	0
Distúrbios neurológicos	1 (3,3)		
Convulsões	1 (3,3)	0	1
Psicose	0 (0,0)	0	0
Distúrbios hematológicos	20 (66,7)		
Anemia hemolítica	0 (0,0)	0	0
Leucopenia	12 (40,0)	7**	5
Linfopenia	4 (13,3)	1**	3
Trombocitopenia	4 (13,3)	1	3
Distúrbios imunológicos	5 (16,7)		
Anti-fosfolípidos	0 (0,0)	0	0
Anti-DNA	2 (6,7)	2	0
Anti-Sm	2 (6,7)	1	1
VDRL falso-positivo	1 (3,3)	0	1
Anticorpo antinúcleo (FAN-Hep2)	14 (46,7)	6	8

*Uma mesma paciente apresentava pleurite e pericardite

** Uma mesma paciente apresentava linfopenia e leucopenia

As manifestações clínicas mais prevalentes foram o *rash* malar e distúrbios hematológicos, apresentados por 66,7% dos pacientes no momento do diagnóstico. Em segundo lugar, tem-se distúrbio renal (60,0%), seguido por fotossensibilidade (50,0%) e artrite e FAN-Hep2 (46,7%). É possível que a presença de FAN-Hep2 tenha sido subnotificada nos prontuários.

5.2 Análise proteômica

5.2.1 Obtenção dos extratos proteicos

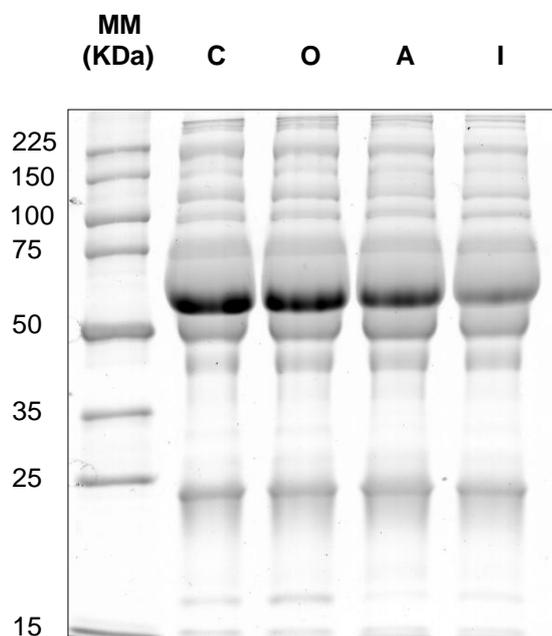
A partir de 150 μL de amostra de soro (*pool* das 15 amostras de cada grupo), foram obtidos 500 μL de extrato proteico após completa solubilização do precipitado em Tampão de Lise. As proteínas foram quantificadas, tendo sido as dosagens realizadas em triplicata e os valores médios apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Concentração proteica média dos extratos, conforme dosagem com o *2D Quanti Kit*® (GE-Healthcare). C: controle; O: outras doenças autoimunes; A: LES ativo; I: LES inativo.

Amostra	Concentração média de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Volume de extrato proteico obtido (μL)	Volume de amostra de soro utilizado na extração (μL)
C	19,53	500	150
O	19,81	500	150
A	19,72	500	150
I	19,49	500	150

A **Figura 3** mostra o SDS-PAGE utilizado para verificar a qualidade dos extratos proteicos e para conferir o processo de quantificação. Foram aplicados 5 μL de padrão de MM (Promega® V4891) e 20 μg de proteínas de cada amostra. O gel foi corado por *Coomassie Brilliant Blue R-250* e digitalizado no equipamento *ImageScanner*™ III (Amersham Biosciences), utilizando-se o *software Labscan*™.

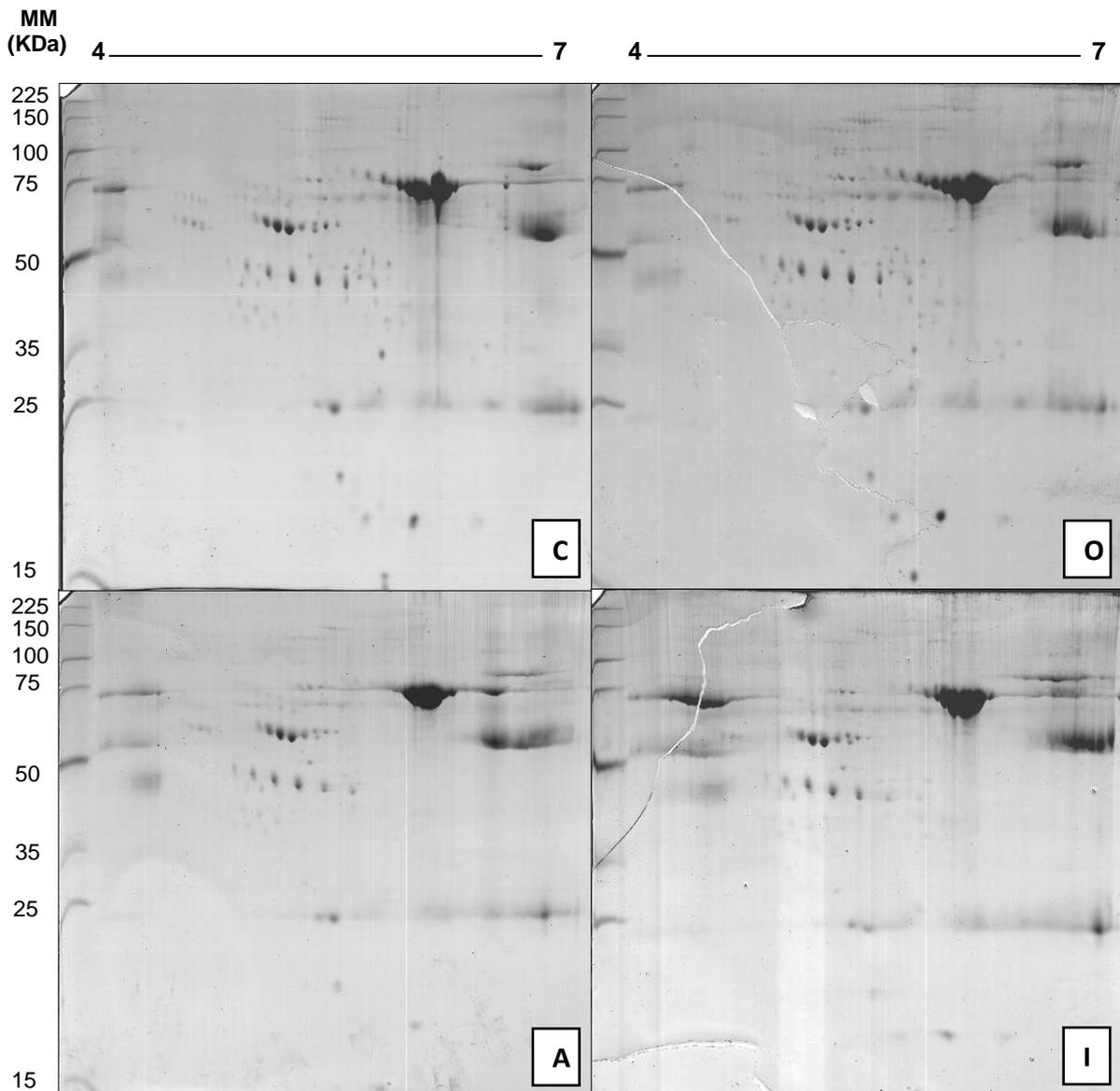
Figura 3 - Gel SDS-PAGE 12% dos extratos proteicos obtidos dos grupos controle (C), de outras doenças autoimunes (O), LES ativo (A), LES inativo (I). MM: Padrão de massa molecular (Promega® V4891).



5.2.2 Eletroforese bidimensional

Antes de realizar a técnica 2D-DIGE, foram confeccionados géis 2DE para se obter o perfil de separação bidimensional das proteínas e verificar a eficiência do processo de IEF para cada uma das amostras. Para tanto, foram utilizadas *strips* de 18 cm e gradiente de pH 4-7. Os géis foram corados por *Coomassie Brilliant Blue G-250* e sua imagens capturadas, utilizando-se o equipamento *ImageScanner™ III* (Amersham Biosciences) e o *software Labscan™*. A **Figura 4** apresenta os perfis de separação das amostras.

Figura 4 Géis 2-DE, *strips* de 18 cm de comprimento, gradiente de pH 4-7, carregadas com 700 µg de proteínas e SDS-PAGE a 12% corados por *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Grupos: controle (C), outras doenças autoimunes (O), LES ativo (A) e LES inativo (I). MM: Padrão de massa molecular (Promega® V4891).



5.2.3 Eletroforese diferencial em gel bidimensional (2D-DIGE)

Após obter o perfil de separação bidimensional de cada uma das amostras, foi realizada a parte experimental de 2D-DIGE. As **figuras 5 e 6** exemplificam as imagens geradas após escaneamento dos géis fluorescentes no equipamento *Typhoon FLA 9000* (GE-Healthcare). Utilizaram-se os seguintes parâmetros de comprimentos de onda para excitação e emissão de fluorescência: Cy2 (488/520nm), Cy3 (532/580nm) e Cy5 (633/670nm). Ao todo foram geradas 24 imagens, sendo quatro imagens por gel (Cy2, Cy3 e Cy5 e uma imagem de sobreposição). Para as análises de diferenças de intensidades dos *spots* no *DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v7.2* (GE-Healthcare), foram utilizadas as imagens em preto e branco correspondentes a cada imagem fluorescente de Cy2, Cy3 e Cy5.

Figura 5 - Imagens do 2D-DIGE (gel nº 2) adquiridas no *scanner Typhoon FLA 9000* (GE-Healthcare). Foram utilizadas *strips* de 18 cm, gradiente de pH 4 – 7 com 50 µg de proteínas marcadas com os fluoróforos. Imagem em preto e branco de LES ativo (centro). (A) Mix das amostras (C+O+A+I) marcado com Cy2, utilizado para normalização, como controle interno da reação; (B) outras doenças autoimunes marcado com Cy3; (C) LES ativo marcado com Cy5; (D) sobreposição das três imagens (Cy2, Cy3 e Cy5).

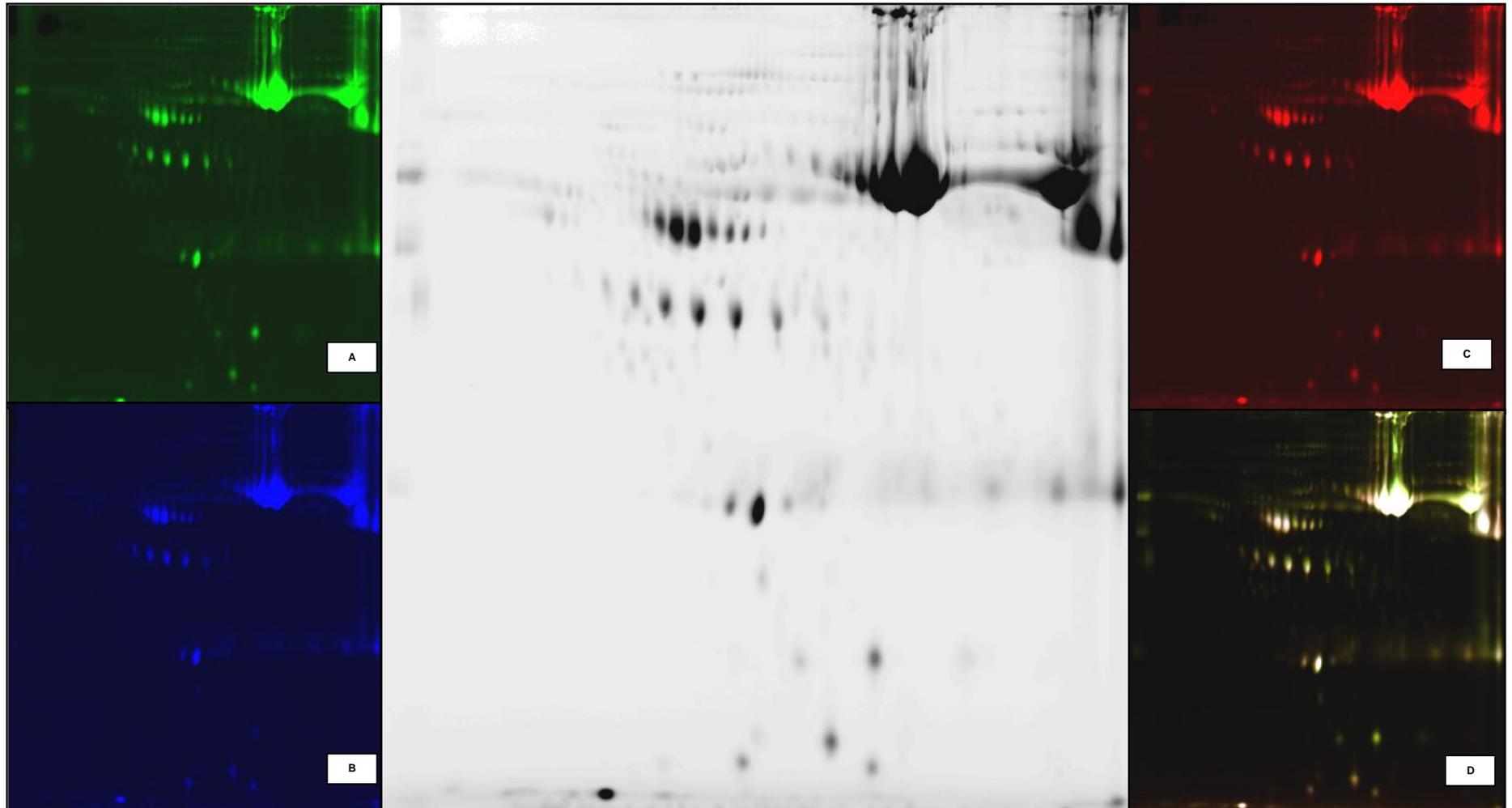
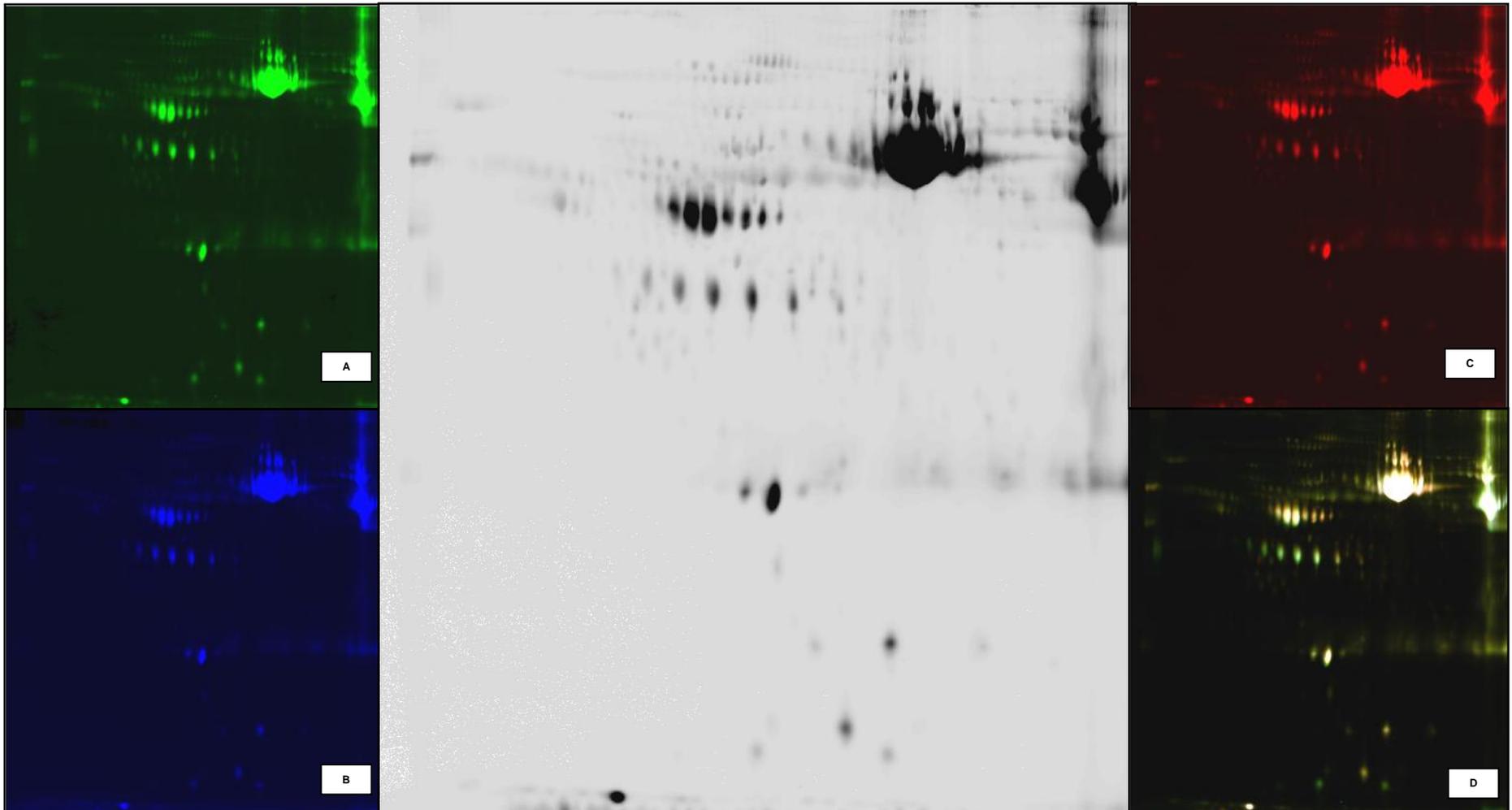


Figura 6 - Imagens do 2D-DIGE (gel nº 3) adquiridas no *scanner Typhoon FLA 9000* (GE-Healthcare). Foram utilizadas *strips* de 18 cm, gradiente de pH 4 – 7 com 50 µg de proteínas marcadas com os fluoróforos. Imagem em preto e branco de LES inativo (centro). (A) Mix das amostras (C+O+A+I) marcado com Cy2, utilizado para normalização, como controle interno da reação; (B) LES inativo marcado com Cy3; (C) controle marcado com Cy5; (D) sobreposição das três imagens (Cy2, Cy3 e Cy5).



5.2.4 Análise das imagens

As imagens obtidas foram analisadas utilizando-se o *DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v7.2* (GE - Healthcare). Através do módulo *Image Loader*, as imagens obtidas no escaneamento foram importadas para o banco de dados do *software*, a fim de torná-las disponíveis para detecção dos *spots*, quantificação e normalização de seus volumes no módulo DIA. Uma criteriosa e detalhada edição manual foi realizada em cada uma das imagens com o objetivo de excluir artefatos equivocadamente detectados como *spots* e incluir *spots* não detectados como tal. Essa etapa foi essencial para garantir a qualidade das análises subsequentes.

Após edição, as imagens foram exportadas para o BVA, onde foram realizados os *matches* para sobrepor os *spots* em comum. Em seguida, foram avaliadas as diferenças de intensidade dos *spots* entre os grupos através dos testes estatísticos *T-Student* e *One-Way ANOVA*, de modo que *spots* com $p \leq 0,05$ e *fold change* $> 1,5$, foram considerados. Um total de 171 *spots* foram selecionados. A **Tabela 5** apresenta as comparações estatísticas realizadas e o número de *spots* com diferença de intensidade para cada análise. Observa-se que as maiores diferenças, em número de *spots*, encontram-se entre os grupos de LES ativo e LES inativo em relação ao grupo controle e a menor diferença entre LES ativo e LES inativo.

Tabela 5 – Número de *spots* com diferença de intensidade entre os grupos de estudos. C: controle; O: outras doenças autoimunes; A: LES ativo; I: LES inativo.

Grupos comparados	Spots diferencialmente intensos ($p \leq 0,05$)	↑Intensidade	Número de <i>spots</i>
A versus C	83	A	53
		C	30
I versus C	57	I	36
		C	21
O versus C	14	O	12
		C	2
A versus I	10	A	5
		I	5
A versus O	49	A	35
		O	14
I versus O	20	I	9
		O	11

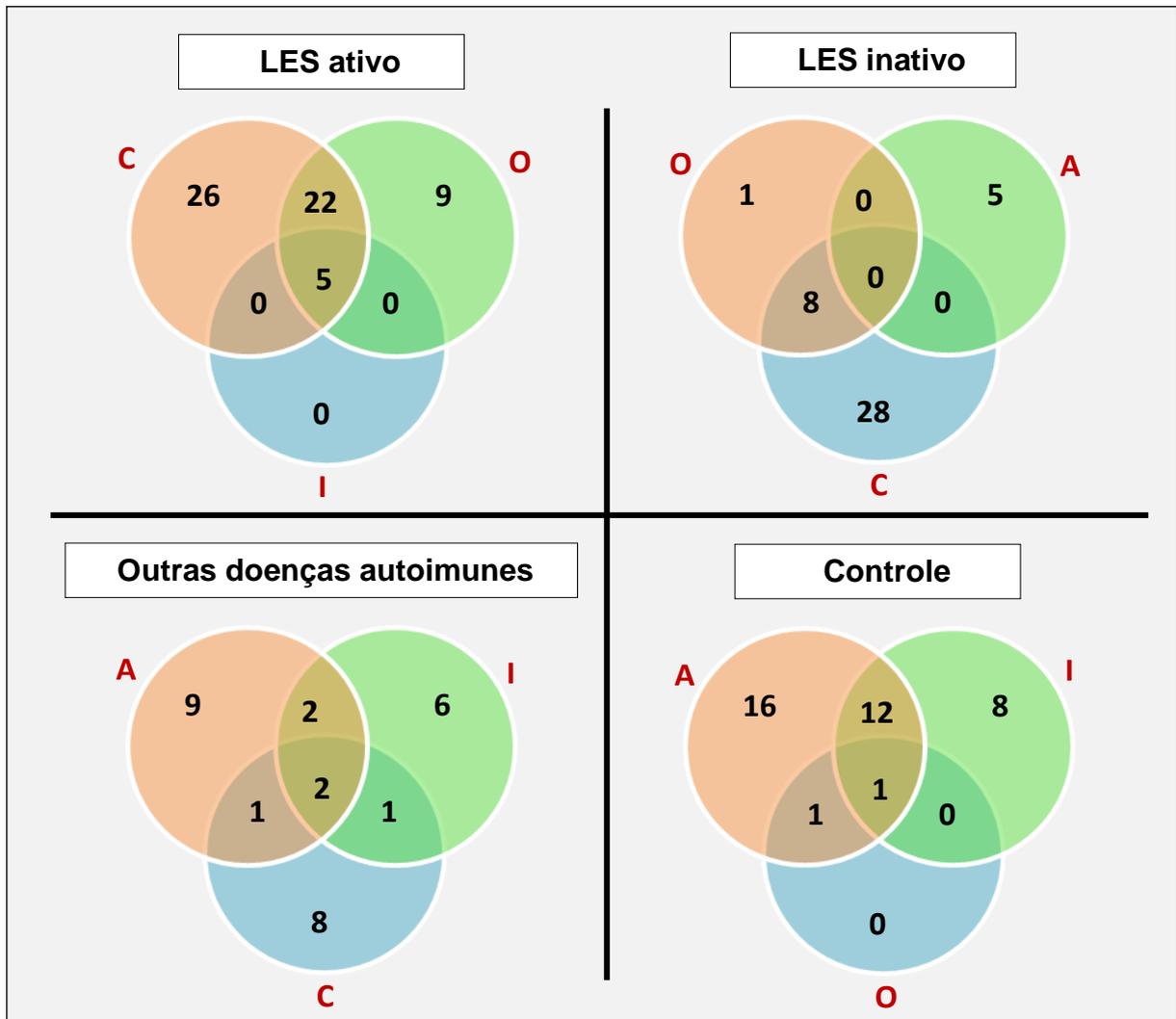
A **Tabela 6** apresenta as diferenças de intensidade dos *spots* de cada grupo em relação aos demais e o número real de *spots* retirados do gel, por grupo. Observa-se que o número de *spots* retirados é inferior à soma dos *spots* diferencialmente intensos por grupo de referência, o que ocorreu devido a sobreposição de *spots* selecionados entre os grupos comparados.

Para melhor compreensão das análises, as informações contidas na **Tabela 6** foram expressas graficamente através um diagrama de Venn por grupo de referência (**Figura 7**), ou seja, grupo em que os *spots* apresentaram aumento de intensidade em relação aos demais.

Tabela 6 - Número de *spots* com diferença de intensidade, selecionados por grupo, e número de *spots* retirados do gel. C: controle; O: outras doenças autoimunes; A: LES ativo; I: LES inativo.

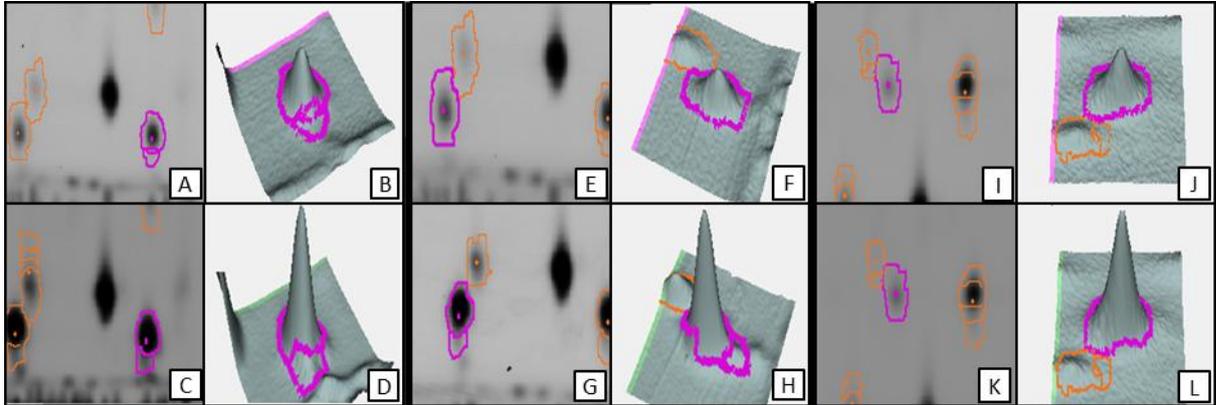
Grupo referência (↑intensidade)	Grupo comparado (↓intensidade)	Nº de <i>spots</i> selecionados	Nº total de <i>spots</i> retirados
C	A	30	38
	I	21	
	O	2	
O	A	14	29
	C	12	
	I	11	
A	C	53	62
	O	35	
	I	5	
I	C	36	42
	O	9	
	A	5	
Total			171

Figura 7 - Diagramas de Venn mostrando o número de *spots* com intensidade aumentada por grupo em relação aos demais e as interseções entre os grupos. C: controle; O: outras doenças autoimunes; A: LES ativo; I: LES inativo.



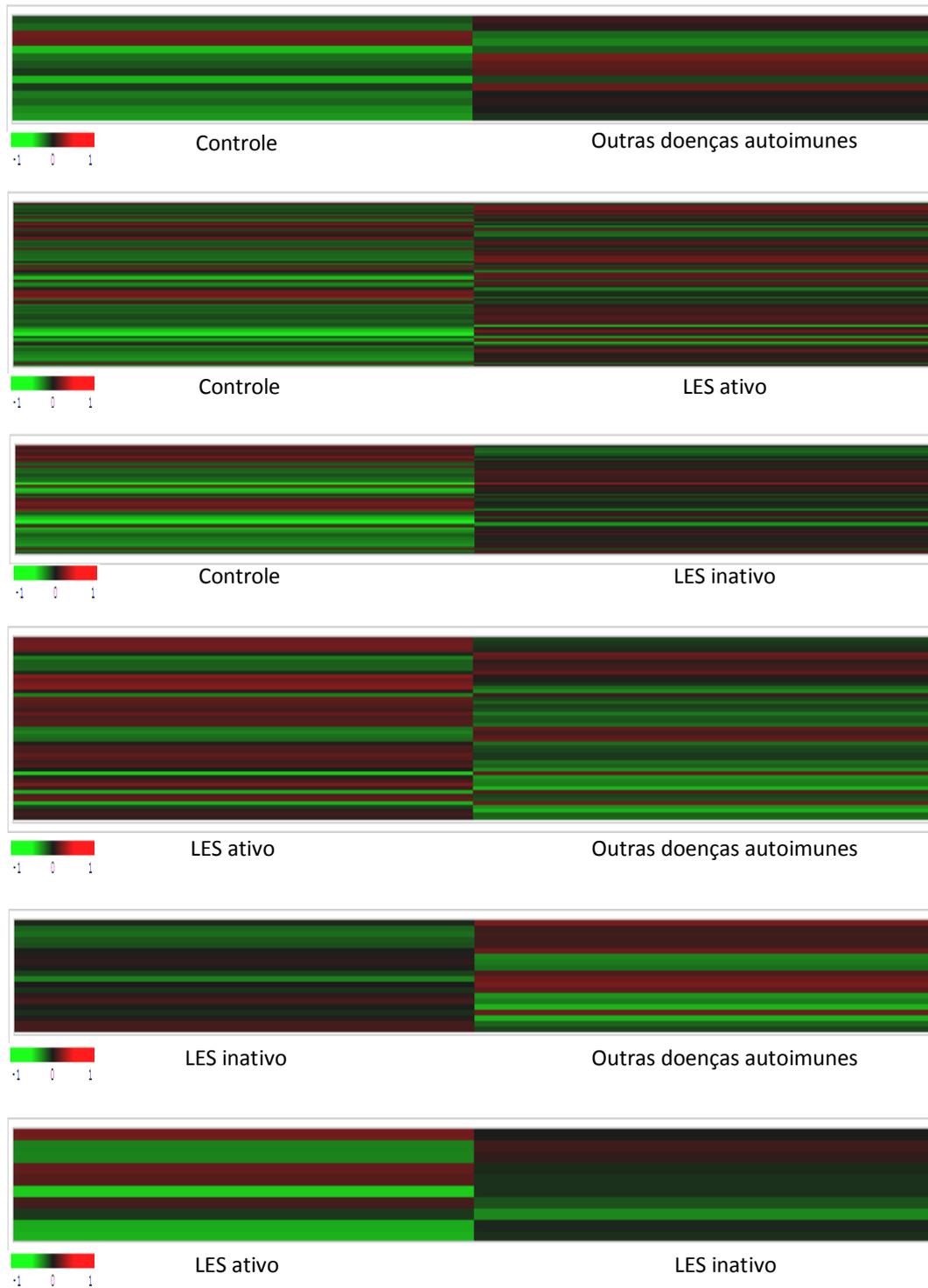
Spots com diferença significativa de intensidade podem ser visualizados tridimensionalmente no módulo DIA conforme exemplo demonstrado na **Figura 8**.

Figura 8 - Imagem representativa da diferença de intensidade entre um *spot* do controle (A) e sua representação tridimensional (B), em relação ao mesmo *spot* do LES ativo (C) e sua representação tridimensional (D). *Spot* do controle (E) e sua demonstração tridimensional (F) menos intenso quando comparado ao mesmo *spot* do LES inativo (G) e sua demonstração tridimensional (H). Por fim, diferença de intensidade entre *spot* do LES ativo (I) e sua representação tridimensional (J) e LES inativo (K) e sua representação tridimensional (L).



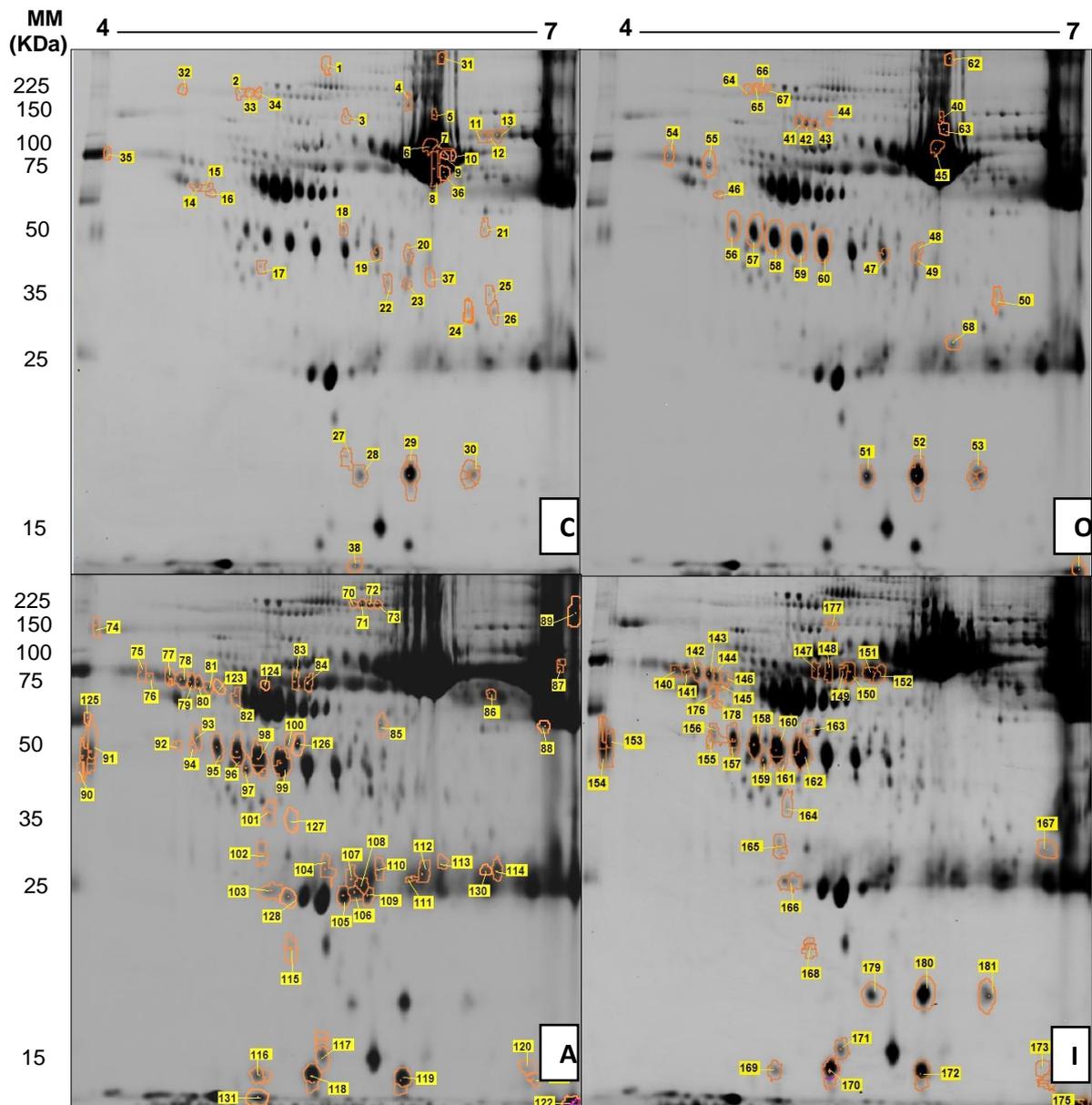
Por fim, utilizou-se o módulo EDA para analisar o padrão de intensidade comparando-se apenas os *spots* com diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre os grupos comparados. Foram realizadas as seguintes comparações: LES ativo *versus* Controle, LES inativo *versus* Controle, Outras doenças autoimunes *versus* Controle, LES ativo *versus* LES inativo, LES ativo *versus* Outras doenças autoimunes, LES inativo *versus* Outras doenças autoimunes. A **Figura 9** apresenta os agrupamentos hierárquicos dos *spots* selecionados. A diferença de intensidade é visualizada através de escala colorimétrica, em que quanto maior o brilho da cor verde, mais regulada negativamente (-1) é a intensidade em relação ao mesmo *spot* do outro grupo de comparação; e, quanto maior o brilho da cor vermelha, maior a intensidade do *spot* (+1) em relação ao mesmo *spot* no outro grupo.

Figura 9 - Agrupamentos hierárquicos (*Pattern Analysis*) entre os grupos de estudo, considerando-se os *spots* selecionados ($p \leq 0,05$) após testes *T-sudent* e *One-Way ANOVA*. Os valores de intensidade relativa estão exibidos na escala colorimétrica utilizando o log de abundância padronizado, com variação de -1 (regulado negativamente; verde) até 1 (regulado positivamente; vermelho).



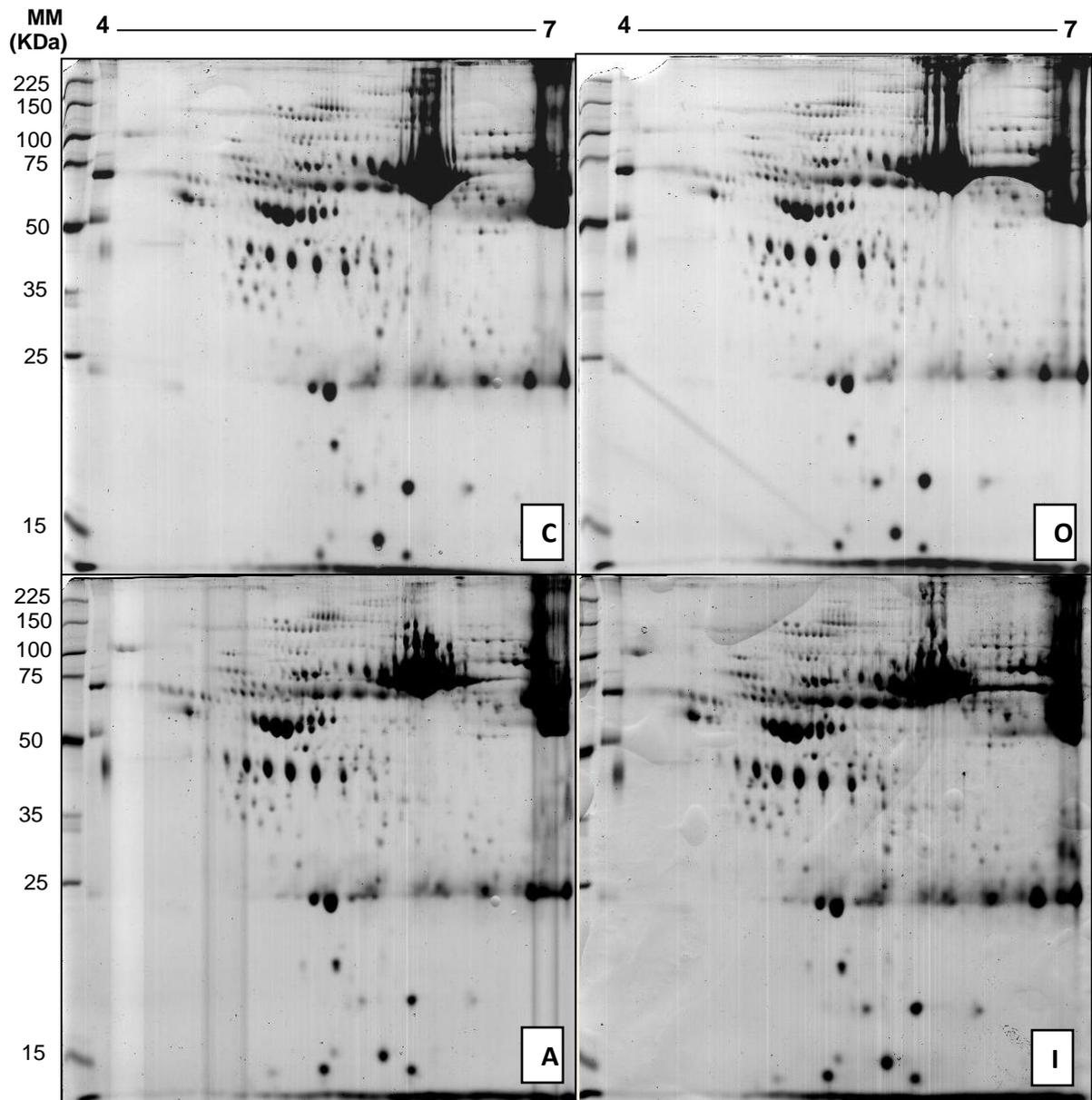
Os *spots* com diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) foram selecionados para a excisão do gel e identificação por espectrometria de massas. A **Figura 10** apresenta as imagens geradas no *Decyder*TM para *spots* selecionados como mais intensos de cada grupo em relação aos demais.

Figura 10 - Imagens geradas no *Decyder*TM representando os *spots* com intensidade aumentada ($p \leq 0,05$), por grupo analisado, selecionados após testes *T-sudent* e *One-Way ANOVA*. (C) *spots* com aumento de intensidade no grupo controle em relação aos demais; (O) *spots* com aumento de intensidade em outras doenças autoimunes; (A) *spots* com aumento de intensidade no LES ativo; (I) *spots* com aumento de intensidade no LES inativo. MM: Padrão de massa molecular (Promega® V4891). Números dos *spots* correspondem aos números utilizados nas tabelas 8 e 9.



É possível observar na **Figura 11** os géis 2DE utilizados para excisão de *spots*. Pode-se verificar que a coloração dos géis por *Coomassie Brilliant Blue G-250* foi eficiente em revelar todos os *spots* selecionados para identificação espectrométrica, o que tornou simples e precisa a remoção dos *spots* a partir das imagens geradas pelo *software*.

Figura 11 - Géis 2-DE utilizados para excisão de *spots* selecionados. Foram utilizadas *strips* de 18 cm de comprimento, gradiente de pH 4-7, carregadas com 700 μ g de proteínas e SDS-PAGE a 12%. Os géis foram corados por *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Grupos: (C) controle; (O): outras doenças autoimunes; (A): LES ativo; (I): LES inativo. MM: Padrão de massa molecular (Promega® V4891).



5.2.5 Identificação das proteínas

Todos os *spots* selecionados ($p \leq 0,05$) foram excisados dos géis, tratados com tripsina e submetidos à espectrometria de massas. Do total de 171 *spots* retirados, 137 foram identificados com sucesso (80% de identificação) e corresponderam a 103 diferentes proteínas. A **Tabela 7** apresenta o resumo dos *spots* selecionados e removidos para identificação, por grupo, e os *spots* identificados.

Tabela 7 - Informações sobre os *spots* removidos para identificação espectrométrica por grupo em que apresentou aumento de intensidade. C: controle; O: outras doenças autoimunes; A: LES ativo; I: LES inativo

Grupo ↑INTENSIDADE	<i>Spots</i> selecionados	<i>Spots</i> identificados	Codificação dos <i>spots</i> retirados
C	38	27	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38
O	29	25	40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68
A	62	50	70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131
I	42	35	140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181
Total	171	137	

* Em vermelho, *spots* não identificados.

Spots iguais quanto ao pI e MM com aumento de intensidade simultaneamente em grupos diferentes foram codificados com números diferentes, a fim de facilitar as análises. A **Tabela 8** apresenta a lista dos *spots* redundantes e a correspondência entre eles.

Tabela 8 - Correspondência entre os spots redundantes. C: controle; O: outras doenças autoimunes; A: LES ativo; I: LES inativo.

C	O	A	I
5	40	-	-
6	45	-	-
19	47	-	-
20	49	-	-
25	50	-	-
28	51	-	179
29	52	-	180
30	53	-	181
31	62	-	-
33	65	-	-
34	66	-	-
-	44	-	177
-	46	-	178
-	54	76	140
-	55	80	144
-	56	95	157
-	57	96	158
-	58	98	160
-	59	99	162
-	61	122	175
-	68	113	-
-	-	78	142
-	-	79	143
-	-	80	144
-	-	81	146
-	-	83	147
-	-	84	148
-	-	90	153
-	-	91	154
-	-	93	156
-	-	94	155
-	-	97	159
-	-	100	163
-	-	101	164
-	-	102	165
-	-	103	166
-	-	115	168
-	-	116	169
-	-	117	171
-	-	118	170
-	-	119	172
-	-	120	173
-	-	121	174

Na **Tabela 9**, podem ser visualizadas as proteínas diferencialmente abundantes identificadas, seus *GenInfo Identifier* (gi), os respectivos *spots* e os grupos em que apresentaram aumento de abundância para as comparações realizadas. Observa-se que diversas proteínas foram identificadas em mais de um *spot* de um mesmo gel, o que pode ser justificado pela presença de isoformas ou modificações pós-traducionais. Como exemplo, a proteína *haptoglobin precursor* foi identificada nos *spots* 155, 156, 157, 158, 160, 162, 170, 172, 179, 180, 181, os quais possuem diferentes MM e pl. Por outro lado, em alguns *spots* foram identificadas várias proteínas, sendo que, para as análises, todas foram consideradas. Alguns *spots* apresentaram aumento de intensidade em um grupo em relação a dois ou mais grupos, simultaneamente. Esses dados, bem como as proteínas identificadas por *spots*, podem ser visualizados no APÊNDICE B.

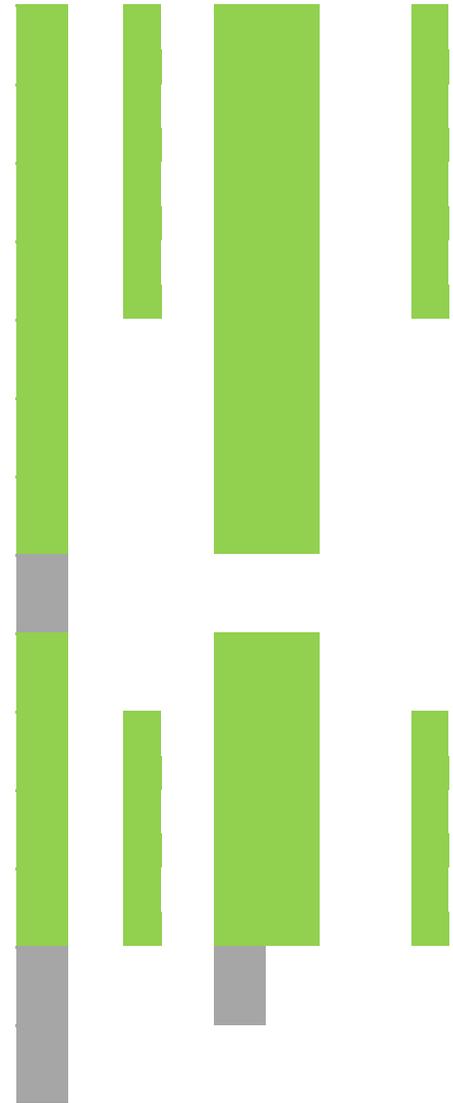
As proteínas com aumento de abundância no LES ativo (A) e LES inativo (I), simultaneamente, em relação ao controle (C) e outras doenças autoimunes (O) e que, portanto, potencialmente diferenciam LES de não LES estão marcadas em amarelo (6 proteínas) (**Tabela 9**). Proteínas com aumento de abundância em LES ativo em relação aos demais grupos, potencialmente capazes de diferenciar a forma ativa da doença estão marcadas em verde (40 proteínas). As proteínas 62 e 90 (**Tabela 9**), *apolipoprotein A-IV precursor* e *SP-40,40, partial* marcadas em alaranjado, apresentaram aumento de abundância no LES ativo em relação ao controle e outras doenças autoimunes e no LES inativo em relação ao controle. Enquanto as proteínas *alpha-1-acid glycoprotein 1*, *Orosomuroid 1*, *Zn-alpha2-glycoprotein*, *protein AMBP preproprotein* e *alpha1 acid glycoprotein*, números 58, 59, 64, 88 e 94 (**Tabela 9**), apresentaram aumento de abundância no LES ativo e LES inativo em relação ao controle, mas não apresentaram diferença entre LES e outras doenças autoimunes.

Também foi investigada a presença de proteínas que apresentassem diminuição da abundância no LES ativo e LES inativo em relação ao controle e outras doenças autoimunes. As proteínas números 46, 85 e 101 (**Tabela 9**), correspondentes, respectivamente, à *immunoglobulin mu heavy chain partial*, *Ig mu heavy chain disease protein* e *unnamed protein product* (gi|33451) apresentaram diminuição de abundância no LES ativo e LES inativo em relação ao controle, mas não apresentaram diferença em relação ao grupo de outras doenças autoimunes.

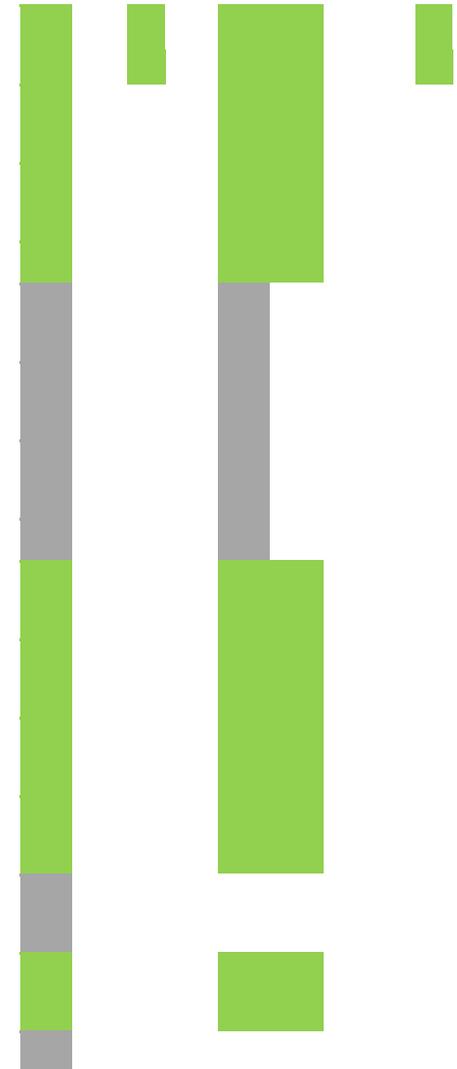
Tabela 9 - Lista das proteínas identificadas, seus respectivos gl, número dos spots e aumento de abundância conforme comparações realizadas.

Proteína	gl	Nome da proteína	Número do spot	C x O		C x A		C x I		O x A		A x I		O x I	
				↑C	↑O	↑C	↑A	↑C	↑I	↑O	↑A	↑A	↑I	↑O	↑I
1	gi 306882	haptoglobin precursor	19, 20, 28, 29, 30, 47, 49, 51, 52, 53, 56, 57, 58, 59, 60, 92, 93, 94, 95, 96, 98, 99, 118, 119, 155, 156, 157, 158, 160, 162, 170, 172, 179, 180, 181												
2	gi 4826762	haptoglobin isoform 1 preproprotein	19, 20, 28, 29, 30, 47, 49, 51, 52, 53, 56, 57, 58, 59, 60, 93, 94, 95, 96, 98, 99, 118, 119, 155, 156, 157, 158, 160, 162, 170, 172, 179, 180, 181												
3	gi 229323	haptoglobin alpha2	28, 29, 51, 52, 53, 118, 170, 179, 180, 181												
4	gi 28592	serum albumin	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 23, 24, 26, 31, 36, 37, 40, 45, 62, 63, 85, 86												
5	gi 230651	Chain A, Structure Of Prealbumin, Secondary, Tertiary And Quaternary Interactions Determined By Fourier Refinement At 1.8 Angstroms	117, 171												
6	gi 170684608	immunoglobulin kappa 1 light chain	103, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 166												
7	gi 170684576	immunoglobulin kappa 4 light chain	103, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 166												
8	gi 170684484	immunoglobulin kappa 4 light chain	103, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 166												
9	gi 21669347	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	103, 106, 107, 109, 111, 113, 166												

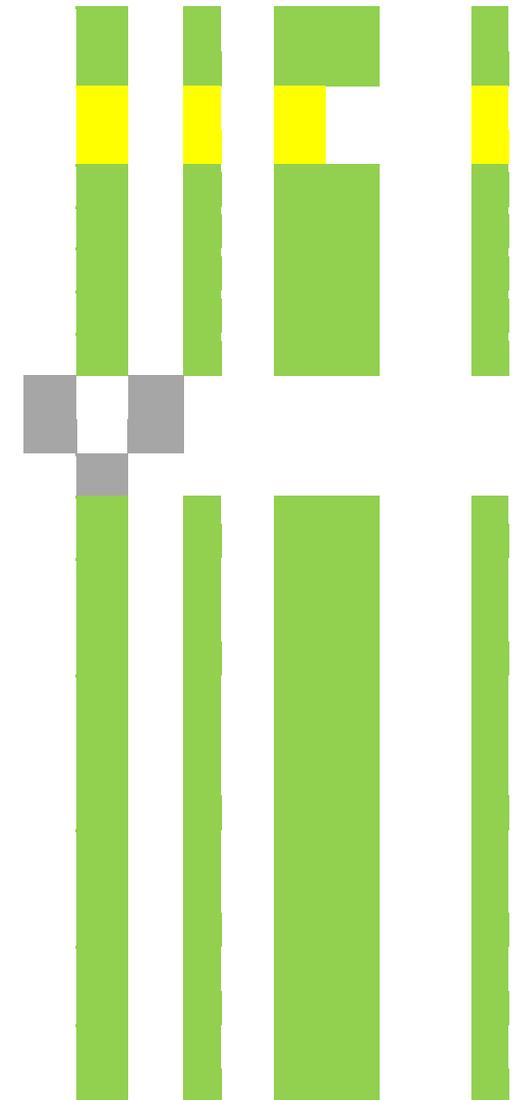
10	gi 21669331	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	103, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 166
11	gi 21669377	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	103, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 166
12	gi 21669317	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	103, 106, 108, 111, 166
13	gi 21669321	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	103, 106, 108, 111, 166
14	gi 15722775	immunoglobulin kappa chain variable region	108
15	gi 109240666	immunoglobulin kappa chain variable region	108
16	gi 98956376	immunoglobulin kappa light chain variable region	108
17	gi 453071236	immunoglobulin kappa light chain variable region, partial	106
18	gi 507342	immunoglobulin kappa light chain V-Jk4	108, 111
19	gi 444737639	immunoglobulin light chain kappa, partial	103, 106, 108, 111, 166
20	gi 185925	immunoglobulin kappa-chain VK-1, partial	103, 106, 108, 111, 166
21	gi 339272253	immunoglobulin VH_5c kappa chain	103, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 166
22	gi 539616	Ig kappa chain precursor V-J-C region - human (fragment)	111
23	gi 125756	RecName: Full=Ig kappa chain V-I region AG	106



24	gi 1633496	Chain L, Tr1.9 Fab Fragment Of A Human Igg1 Kappa Autoantibody	103, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 166
25	gi 478602	Ig lambda chain V region - human	104, 107, 108, 111, 112, 113, 114
26	gi 21669493	immunoglobulin lambda light chain VLJ region	104, 107, 108, 110, 111, 112, 114
27	gi 170684488	immunoglobulin lambda 1 light chain	107, 108, 110, 111, 112, 113
28	gi 987072	immunoglobulin lambda chain variable region	114
29	gi 587358	immunoglobulin lambda chain variable region	114
30	gi 3142594	immunoglobulin lambda light chain variable region	114
31	gi 219566655	immunoglobulin lambda light chain	114
32	gi 16923209	immunoglobulin light chain variable region	108
33	gi 75707373	immunoglobulin light chain variable region	108
34	gi 8176546	immunoglobulin light chain variable region	108
35	gi 9295287	immunoglobulin light chain variable region	108
36	gi 388778203	immunoglobulin heavy chain variable region, partial	106
37	gi 237702364	immunoglobulin light chain variable region, partial	108
38	gi 2072280	immunoglobulin rearranged light chain	106

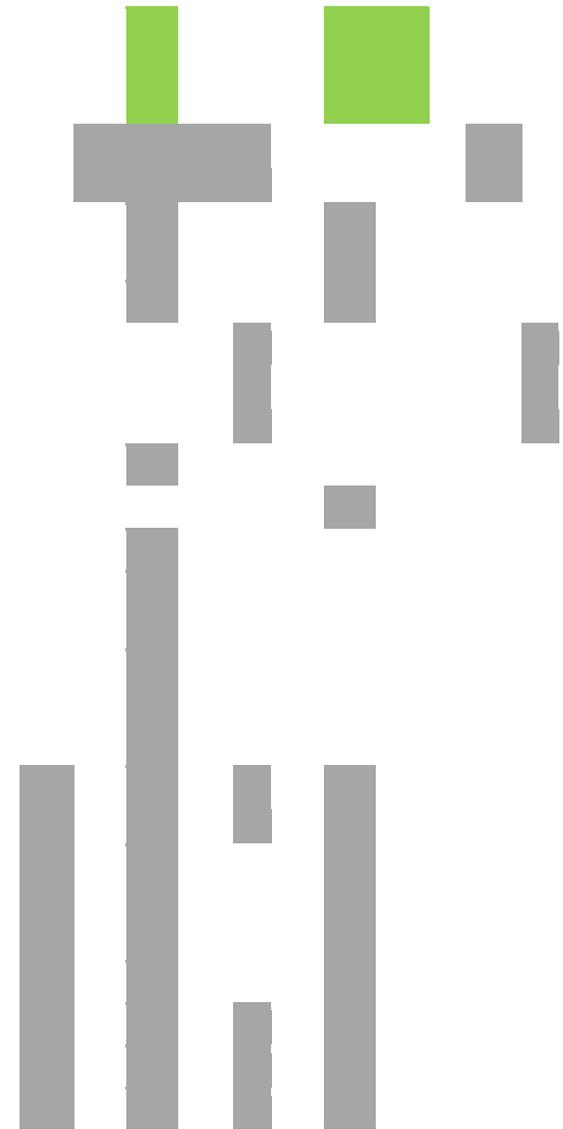


39	gi 149673891	immunoglobulin light chain	103, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 166
40	gi 194173415	immunoglobulin light chain	103, 106, 107, 109, 111, 113, 166
41	gi 323432584	immunoglobulin variable region	103, 106, 108, 111, 113, 166
42	gi 323432988	immunoglobulin variable region	103, 106, 108, 111, 166
43	gi 323433034	immunoglobulin variable region	103, 106, 108, 111, 166
44	gi 323432838	immunoglobulin variable region	103, 106, 108, 111, 166
45	gi 41388186	monoclonal IgM antibody light chain	103, 106, 108, 111, 166
46	gi 390994295	immunoglobulin mu heavy chain, partial	11, 12, 13
47	gi 223815	Ig lambda C	112
48	gi 524453553	IgG L chain	103, 106, 108, 111, 166
49	gi 10835794	Chain A, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of A Human Monoclonal Igm Cold Agglutinin	103, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 166
50	gi 157877246	Chain L, 48g7 Hybridoma Line Fab Complexed With Hapten 5-(Para-Nitrophenyl Phosphonate)-Pentanoic Acid	103, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 166
51	gi 491668788	Chain C, An Antibody Against The C-terminal Domain Of Pcsk9 Lowers Ldl Cholesterol Levels In Vivo	103, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 166
52	gi 344189783	Chain L, Structure Of The 1121b Fab Fragment	103, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 166
53	gi 291191169	Chain L, Crystal Structure Of Li33 Igg1 Fab	103, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 166

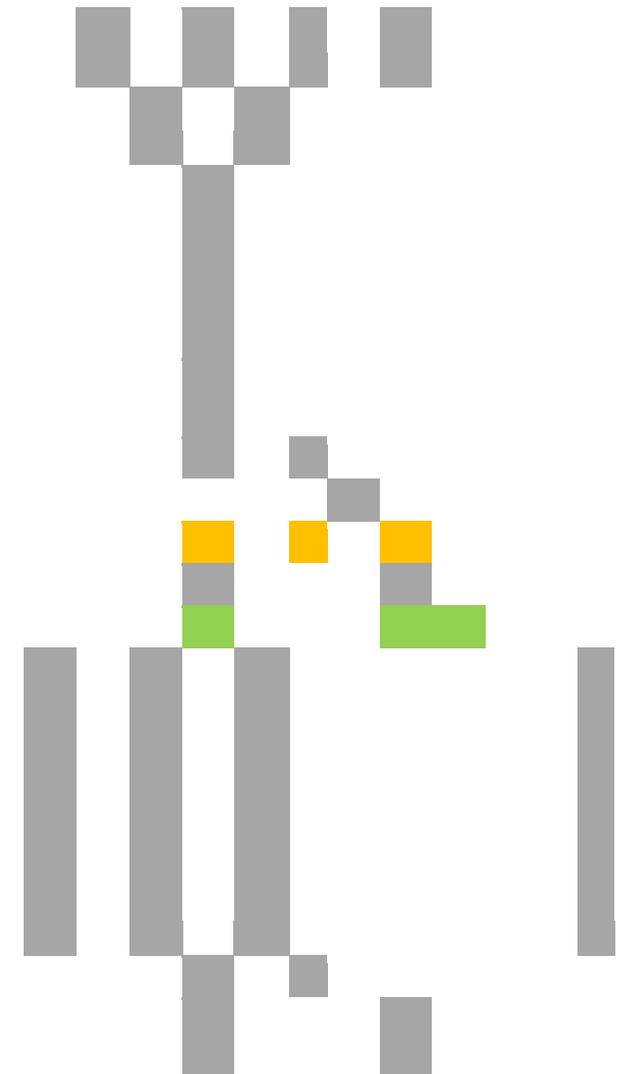


54	gi 2135473	Ig alpha-2 chain - human (fragment)	83, 84, 124, 147, 149, 150, 151, 152					
55	gi 443345	Chain A, Crystal Structure Of Cleaved Human Alpha1-antichymotrypsin At 2.7 Angstroms Resolution And Its Comparison With Other Serpins	54, 55, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 140, 141, 142, 143, 144, 146					
56	gi 8569387	Chain I, P14-Fluorescein-N135q-S380c-Antithrombin-iii	83, 84, 147, 148,					
57	gi 166007160	Chain C, Solution Structure Of Human Immunoglobulin M	104, 107, 108, 111, 112					
58	gi 112877	RecName: Full=Alpha-1-acid glycoprotein 1; Short=AGP 1; AltName: Full=Orosomuroid-1; Short=OMD 1; Flags: Precursor	90, 91, 153, 154					
59	gi 219519923	Orosomuroid 1	90, 91, 153, 154					
60	gi 576554	antithrombin III variant	83, 84, 147, 148,					
61	gi 27552515	Ig L-chain V-region	68, 104, 107, 108, 110, 111, 112, 113					
62	gi 178757	apolipoprotein A-IV precursor	100, 126, 163					
63	gi 2982165	Chain A, Cleaved Antichymotrypsin T345r	54, 55, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 140, 141, 142, 143, 144					
64	gi 38026	Zn-alpha2-glycoprotein	97, 159, 161					
65	gi 17942890	Chain A, An Engineered Transthyretin Monomer That Is Non-Amyloidogenic - Unless Partially Denatured	117, 171					
66	gi 530394088	PREDICTED: retinol-binding protein 4 isoform X1	115, 168					

67	gi 164519439	Chain L, Fab Fragment In Complex With Small Molecule Hapten, Crystal Form-1	104, 107, 108, 110, 111, 112, 114
68	gi 4504893	kininogen-1 isoform 2 precursor	2, 32, 33, 34, 64, 65, 66, 67, 142, 143, 144, 145, 146
69	gi 90108664	Chain A, Crystal Structure Of Lipid-Free Human Apolipoprotein A-I	105, 109, 129,
70	gi 229479	lipoprotein Gln I	103, 105, 109, 129
71	gi 70058	Ig alpha-2 chain C region - human	147, 149, 150, 151, 152
72	gi 87783	Ig alpha-2 chain C region (allotype A2m(2)) - human (fragment)	147, 149, 150, 151, 152
73	gi 337758	pre-serum amyloid P component	104, 107, 110, 112
74	gi 532198	angiotensinogen	124
75	gi 4557871	serotransferrin precursor	87
76	gi 110590597	Chain A, Apo-Human Serum Transferrin (Non-Glycosylated)	87
77	gi 4389230	Chain A, Human Serum Transferrin, Recombinant N-Terminal Lobe, Apo Form	87
78	gi 46014946	Chain B, Crystal Structure Of Human Hemoglobin E At 1.73 A Resolution	61, 122, 175
79	gi 229751	Chain A, Structure Of Haemoglobin In The Deoxy Quaternary State With Ligand Bound At The Alpha Haems	61, 122
80	gi 179409	beta-globin	61, 122
81	gi 66473265	beta globin chain	61, 122, 175
82	gi 26892090	beta globin chain variant	61, 122, 175
83	gi 66731527	hemoglobin beta chain	61, 122, 175



84	gi 169791771	Chain B, Human Hemoglobin D Los Angeles: Crystal Structure	61, 122, 175
85	gi 127506	RecName: Full=Ig mu heavy chain disease protein; AltName: Full=BOT	11, 12, 13
86	gi 561701	This CDS feature is included to show the translation of the corresponding V_region. Presently translation qualifiers on V_region features are illegal, partial	106
87	gi 310942619	Chain B, The Crystal Structure Of Pcsk9 In Complex With 1d05 Fab	106
88	gi 4502067	protein AMBP preproprotein	102, 165
89	gi 4501987	afamin precursor	41, 42, 43
90	gi 338305	SP40,40, partial	101, 127, 164
91	gi 224224	antitrypsin alpha1 mutant	82
92	gi 177870	alpha-2-macroglobulin precursor	70, 71, 72, 73
93	gi 112910	RecName: Full=Alpha-2-HS-glycoprotein; AltName: Full=Alpha-2-Z-globulin; AltName: Full=Ba-alpha-2-glycoprotein; AltName: Full=Fetuin-A; Contains: RecName: Full=Alpha-2-HS-glycoprotein chain A; Contains: RecName: Full=Alpha-2-HS-glycoprotein chain B;	14, 15, 176
94	gi 229386	protein,alpha1 acid glyco	90, 91, 153, 154
95	gi 16418467	leucine-rich alpha-2-glycoprotein precursor	92



96	gi 401871712	Chain B, Complement C4 In Complex With Masp-2	44, 177	
97	gi 1314244	complement C4B precursor	44, 177	
98	gi 34365085	hypothetical protein	83, 84, 147, 148, 149, 150, 151, 152	
99	gi 16554039	unnamed protein product	104, 107, 108, 111, 112	
100	gi 193787435	unnamed protein product	54, 55, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 140, 141, 142, 143, 144, 146	
101	gi 33451	unnamed protein product	11, 12, 13	
102	gi 29446	unnamed protein product	61, 122, 175	
103	gi 18044241	Unknown (protein for MGC:31936)	104, 107, 108, 110, 111, 112, 114	

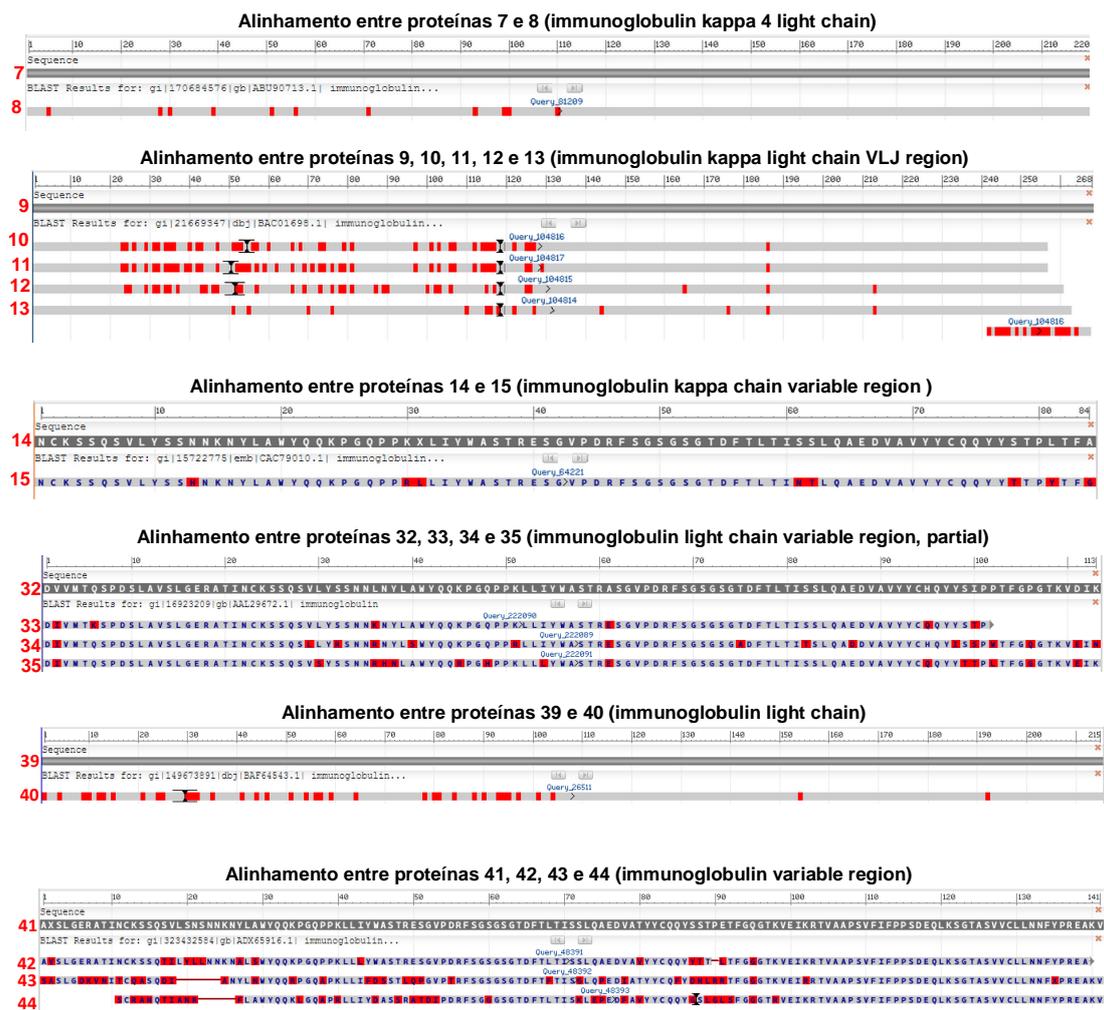
*Em verde, proteínas com aumento de abundância em LES ativo em relação aos outros grupos de análise.

**Em amarelo, proteínas com aumento de abundância em LES ativo e LES inativo em relação aos outros grupos de análise.

***Em alaranjado, proteínas com aumento de abundância no LES ativo em relação ao controle e outras doenças autoimunes e no LES inativo em relação ao controle.

Proteínas de mesmo nome, mas gl diferentes tiveram suas sequências comparadas utilizando o BLASTp, a fim de obter a homologia entre elas. Foram realizados alinhamentos locais, tendo sido considerados significativos aqueles com $e\text{-value} \leq e^{-10}$. As **Figuras 12 e 13** representam graficamente os alinhamentos obtidos. Todos os alinhamentos da **Figura 12** obtiveram cobertura (*Query cover*) >95%, similaridade (*Ident*) >70% e $e\text{-value} \leq e^{-66}$.

Figura 12 - Alinhamentos no BLASTp para proteínas de mesmo nome, mas gl diferentes.



O alinhamento realizado entre as proteínas *unnamed protein product* demonstrado na **Figura 13** só apresentou $e\text{-value}$ significativo entre as proteínas 99 e 101 ($e\text{-value} 7e^{-66}$), mas com cobertura (*Query cover*) e similaridade (*Ident*) de apenas 87% e 28%, respectivamente, apresentando, portanto, pouca semelhança entre si.

Figura 13 - alinhamento realizado entre as proteínas 99, 100, 101 e 102 (*unnamed protein product*) utilizando-se o BLASTp.



Quanto às proteínas identificadas na **Tabela 9** como diferencialmente abundantes no LES em relação aos grupos não LES (verde, amarelo e alaranjado), foram realizadas buscas em bancos de dados de proteínas como NCBI, Uniprot e RCSB/PDB, a fim de obter informações sobre suas funções, genes codificantes, tamanho em aminoácidos, homologia com outras proteínas de *Homo sapiens* e patentes depositadas. Não foi possível realizar a categorização funcional das proteínas de interesse, uma vez que não foram obtidos dados suficientes para a maioria delas.

Considerou-se promissoras as proteínas *Chain A, Structure Of Prealbumin, Secondary, Tertiary And Quaternary Interactions Determined By Fourier Refinement At 1.8 Angstroms* (gi|230651); *Ig alpha-2 chain - human (fragment)* (gi|2135473); *PREDICTED: retinol-binding protein 4 isoform X1* (gi|530394088); *alpha-2-macroglobulin precursor* (gi|177870); *apolipoprotein A-IV precursor* (gi|178757); *SP40,40, partial* (gi|338305).

6 DISCUSSÃO

O LES é a doença autoimune sistêmica mais heterogênea clínica e laboratorialmente, na qual é observado largo espectro de manifestações e anormalidades imunopatogênicas. A desregulação imune leva à produção excessiva de autoanticorpos e complexos imunes, ativação do complemento e inflamação tecidual que, juntos, resultam em uma síndrome com envolvimento de múltiplos órgãos e de curso difícil de ser previsto (LIU & DAVIDSON, 2012).

Diversos fatores são correlacionados aos danos no LES e, portanto, podem influenciar a epidemiologia da doença. Destacam-se a etnia, fatores hereditários, condições socioeconômicas, exposição a fatores ambientais e idade (ALARCÓN *et al.*, 2002; PEREIRA VILAR & SATO, 2002; NAKASHIMA *et al.*, 2011). Acomete predominantemente mulheres, sugerindo que a patogênese da doença pode sofrer influência de fatores hormonais e outros ligados ao cromossomo X (SMITH-BOUVIER *et al.*, 2008; PONS-ESTEL *et al.*, 2010; SIMON, 2013).

Nesse contexto, para o presente trabalho, foram recrutadas apenas indivíduos do sexo feminino. A média de idade foi de $32,7 \pm 7,9$ anos para o grupo controle; $41,8 \pm 15,4$ anos para grupo de outras doenças autoimunes; $32,0 \pm 10,1$ anos para LES ativo e $36,5 \pm 9,4$ anos para LES inativo. Não se evidenciou diferenças estatisticamente significativas entre as médias de idades dos grupos de estudo ($p=0,07$ para Teste de Tukey), o que elimina um possível viés de seleção. Pesquisa de biomarcadores séricos no LES, desenvolvido por Huang *et al.* (2009) na China, revelou dados semelhantes em relação às idades, no qual as médias de idade foram de $34,4 \pm 12,9$ anos para pacientes LES; $37,2 \pm 10,0$ para controles saudáveis e $42,2 \pm 11,6$ para controles de outras doenças autoimunes (síndrome de Sjögren primária e secundária e artrite reumatoide).

As manifestações clínicas e laboratoriais mais observadas entre as pacientes de LES deste estudo, no momento do diagnóstico, foram o *rash* malar (66,7%), distúrbios hematológicos (66,7%), distúrbio renal (60,0%), fotossensibilidade (50,0%), artrite (46,7%) e FAN-Hep2 positivo (46,7%). Em recente estudo realizado em Curitiba-PR, Skare *et al.* (2015) revelaram dados semelhantes, com predomínio de distúrbios hematológicos (76,9% no total), fotossensibilidade (76,7%), artrite (61,0%), *rash malar* (52,1%) e glomerulonefrite (40,0%).

A heterogeneidade das manifestações do LES e sua semelhança clínica e laboratorial com outras doenças autoimunes, sobretudo doenças inflamatórias do tecido conjuntivo, tornam o seu diagnóstico complexo e desafiador. A busca por biomarcadores em amostras biológicas, capazes de refletir o estado fisiopatológico da doença, se torna essencial para a definição de estratégias de diagnóstico que sejam mais simples, específicas, objetivas e menos invasivas que as atualmente utilizadas.

O diagnóstico atual exige a interpretação dos complexos critérios desenvolvidos pelo *American College of Rheumatology*, já que nenhum exame laboratorial é suficientemente sensível e específico para um diagnóstico preciso. Além disso, o curso do LES é caracterizado por períodos de ativação e remissão imprevisíveis e, novamente, não há nenhum teste confiável capaz de identificar ou prever o início ou fim de uma ativação.

A proteômica tem se destacado como importante ferramenta na busca por biomarcadores, uma vez que, através do mapeamento e comparação do perfil proteico de fluidos biológicos, em condições clínicas diversas, torna-se possível a identificação de proteínas presentes de forma quantitativa e qualitativamente diversa entre grupos comparados. Nos últimos anos, grupos de pesquisa em doenças autoimunes tem estudado o proteoma sérico e urinário de pacientes com LES com o objetivo de identificar candidatos a biomarcadores que possam caracterizar a doença nas suas formas ativa, inativa e nefrite lúpica (RANA , 2012; MOSLEY , 2006). Entretanto, são escassos os trabalhos que utilizam um grupo controle adicional constituído por outras doenças autoimunes. Haung *et al.* (2009) utilizaram, como grupos controles, tanto amostras de indivíduos saudáveis quanto de indivíduos com outras doenças autoimunes, mas constituído apenas por artrite reumatoide e Síndrome de Sjögren. Nosso trabalho mostra-se inovador, uma vez que objetivou identificar proteínas diferencialmente abundantes no LES em comparação a indivíduos saudáveis e indivíduos portadores de outras doenças autoimunes com características clínicas e laboratoriais semelhantes ao LES, as quais rotineiramente dificultam um diagnóstico precoce. Pretendemos, desta forma, aumentar a especificidade dos potenciais biomarcadores encontrados.

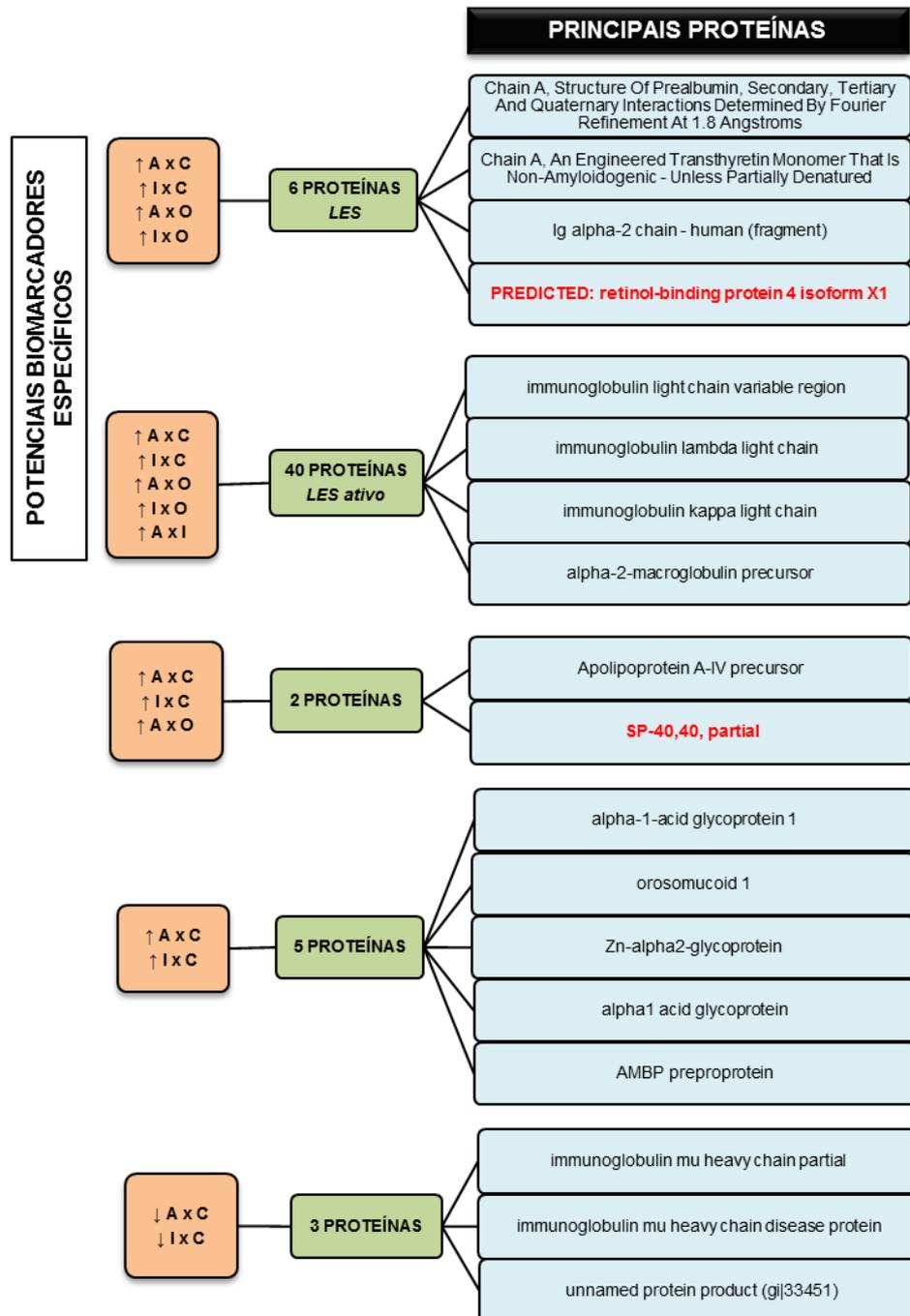
A técnica tradicionalmente utilizada no rastreamento de potenciais biomarcadores do LES é a eletroforese 2D-PAGE associada ao espectrômetro de massas MALDI-ToF/ToF (KAZEMIPOUR *et al.*, 2015; RANA *et al.*, 2012). No entanto, essa técnica pode apresentar algumas limitações, como baixa reprodutibilidade e resolução dos géis. A utilização de corantes fluorescentes nesse tipo de método tem crescido bastante, nos últimos anos, após o desenvolvimento da técnica de eletroforese bidimensional diferencial (*Two-dimensional differential gel electrophoresis* – 2D-DIGE) (HEYWOOD *et al.*, 2011; SRIVASTAVA *et al.*, 2012; AMIN *et al.*, 2014; DUTTA *et al.*, 2015). Essa inovação possibilita o processamento e comparação quantitativa de três amostras em um único gel através da marcação das proteínas com três diferentes fluoróforos (Cy2, Cy3 e Cy5), aumentando a sensibilidade e reprodutibilidade dos experimentos (UNLU *et al.*, 1997). A abundância relativa de uma proteína entre duas ou mais amostras pode ser medida através da comparação da quantidade de fluorescência emitida por cada corante para cada *spot* (MOROUGA *et al.*, 2005).

Muitos trabalhos recentes utilizaram a tecnologia 2D-DIGE na investigação de potenciais biomarcadores sanguíneos em condições clínicas diversas, tais como síndrome de Down (HEYWOOD *et al.*, 2011), leptospirose (SRIVASTAVA *et al.*, 2012), endometriose (DUTTA *et al.*, 2015) e esclerose múltipla (AMIN *et al.*, 2014). No entanto, não se tem registro na literatura do uso dessa tecnologia para a pesquisa de biomarcadores no LES em qualquer de suas fases. Dessa forma, o presente trabalho mostra-se inédito ao utilizar essa abordagem.

Neste trabalho, foram utilizados *pools* de soro como amostras, a fim de reduzir a variabilidade biológica e devido às questões intrínsecas da técnica, como morosidade, custo elevado e complexidade, já que há necessidade de marcação de cada extrato protéico com dois diferentes fluoróforos, corridos em três géis diferentes. Para obter maior resolução dos *spots* na região de pI onde se concentra o maior número de proteínas séricas, utilizou-se *strips* de 18cm com pH de 4-7. Foram detectados uma média de 684 *spots* por gel. Do total de 171 *spots* selecionados como diferencialmente abundantes, 137 foram identificados com sucesso (80%) e corresponderam a 103 diferentes proteínas. O número maior de *spots* em relação ao número de proteínas identificadas se deve ao fato de que muitas vezes a mesma proteína apareceu em *spots* diferentes, o que pode ser justificado pela presença de isoformas ou modi-

ficações pós-traducionais. Os principais resultados obtidos foram sintetizados na **Figura 14**.

Figura 14 - Resumo dos principais resultados obtidos. LES: Lupus Eritematoso Sistêmico; A: LES ativo; I: LES inativo; C: controle; O: outras doenças autoimunes; ↑: abundância aumentada; ↓: abundância diminuída.



As proteínas *alpha-1-acid glycoprotein 1 / orosomuroid 1*, *Zn-alpha2-glycoprotein*, *AMBP preproprotein* e *alpha1 acid glycoprotein* apresentaram aumento de abundância no LES ativo e LES inativo em relação ao controle, mas não apresentaram diferença de abundância entre LES e outras doenças autoimunes. Conforme o *Gene Ontology* - GO, todas essas proteínas se relacionam à regulação negativa da resposta imune. As proteínas *alpha-1-acid glycoprotein 1 / orosomuroid 1*, *Zn-alpha2-glycoprotein* e *alpha1 acid glycoprotein* já foram identificadas e propostas por alguns pesquisadores como potenciais biomarcadores do LES, sobretudo de nefrite lúpica em crianças (OATES *et al.*, 2005; VARGHESE *et al.*, 2007; SUZIKI *et al.*, 2009; WATSON *et al.*, 2012; SOMPARN *et al.*, 2012). *AMBP preproprotein* é uma proteína precursora que, ao sofrer proteólise, dá origem a três proteínas funcionalmente distintas: *alpha-1 microglobulin*, *inter-alpha-trypsin inhibitor light chain* e *Trypstatin* (UniProt). Varghese *et al.* (2007), utilizando 2DE associada a espectrometria de massas MALDI-ToF/ToF, avaliou o proteoma urinário de 32 pacientes com diferentes doenças glomerulares, a fim de definir um padrão de candidatos a biomarcadores capazes de diferenciar glomeruloesclerose segmentar e focal, nefrite lúpica, nefropatia membranosa e nefropatia diabética. A proteína sérica *alpha-1 microglobulin*, fragmento da *AMBP preproprotein*, foi identificada como abundante na urina de pacientes com nefrite lúpica e, então, incluída no painel de potenciais biomarcadores da forma renal do LES. Nossos achados corroboram os dados da literatura, mas alertam para o fato de que essas proteínas podem refletir um estado inflamatório agudo ou de comprometimento renal de modo geral, sem, entretanto, especificidade para o LES, pois, conforme verificamos, não apresentaram abundância diferencial entre LES e outras doenças autoimunes.

As proteínas *immunoglobulin mu heavy chain partial*, *immunoglobulin mu heavy chain disease protein* e *unnamed protein product (gi|33451)*, respectivamente, apresentaram diminuição de abundância no LES ativo e LES inativo em relação ao controle, mas não apresentaram diferença de abundância para demais comparações. A inespecificidade dessas proteínas e a escassez de informações em banco de dados para as sequências de aminoácidos identificadas limitaram a discussão dessas evidências.

Apolipoprotein A-IV precursor e *SP-40,40, partial* são duas proteínas promissoras que mostraram abundância aumentada no LES ativo em relação ao controle e outras

doenças autoimunes e também no LES inativo em relação ao controle. A *apolipoprotein A-IV precursor* é uma proteína de 396 aminoácidos, codificada pelo gene APO-A4, *locus* AAA96731, localizado no cromossomo 11 (ELSHOURBAGY *et al.*, 1987; NCBI; UniProt). A apolipoproteína A-IV (apoA-IV) é sintetizada principalmente pelo intestino e atua como importante componente do HDL e quilomícrons. Tem sido associada a processos biológicos diversos, como absorção e transporte do colesterol e resposta imune inata em mucosas (UniProt). Nosso trabalho corrobora os achados de Dai *et al.* (2008), os quais, ao analisarem mudanças no perfil de proteínas de células mononucleares em sangue periférico (PBMC's) de pacientes com LES, através de 2DE convencional e identificação por espectrometria de massas MALDI-ToF, também verificaram aumento de abundância de *apolipoprotein A-IV precursor* nos pacientes em comparação a indivíduos saudáveis. A proteína SP-40,40, *partial* consiste em um fragmento de 310 aminoácidos da serinoprotease 40,40 (SP-40,40), codificada pelo gene SP40,40, *locus* AAA60567, localizado no cromossomo 8 (NCBI; TOBE *et al.*, 1991). SP40,40 também é referenciada como clusterina e apolipoproteína J (UniProt). Embora as funções biológicas de SP40,40 permaneçam alvo de investigações, Choi *et al.* (1989) foram pioneiros em propor que ela atue como um modulador da formação do complexo de ataque à membrana (MAC) do sistema do complemento, além de atuar como um subcomponente de lipoproteínas de alta densidade (CHOI-MIURA *et al.*, 1992). A deposição de MAC citolítico na membrana das células contribui para resposta inflamatória e necrose tecidual; além disso, a deposição de MAC nos leucócitos levam à ativação celular. Na nefrite lúpica, o dano renal é mediado pela deposição de complexos imunes associados ou não ao MAC (CHAUHAN & MOORE, 2006). Os achados indicam que a SP40,40 pode inibir o sistema do complemento ao se incorporar ao complexo terminal do complemento (SC5b-9) (CHOI *et al.*, 1989). O envolvimento do SC5b-9 no desenvolvimento de lesão renal em pacientes com LES foi relatado por Rother *et al.* (2004) e propõem-se que a SP 40,40, ao se ligar a ele, seja capaz de reduzir danos, uma vez que diminui a quimiotaxia de leucócitos e, principalmente, lise e ativação celular. Embora existam evidências do papel da SP-40,40 na fisiopatologia do LES, nosso trabalho é o primeiro estudo proteômico envolvendo pacientes com LES a propor que SP40,40 seja um potencial biomarcador da doença. Considerando-se que os estudos disponíveis apontam para um possível envolvimento da SP-40,40 na atenuação de lesões renais, e que, conforme revisado por Korte *et al.* (2012), os potenciais biomarcadores

séricos de LES identificados por estratégia proteômica são dependentes dos tipos de órgãos ou tecidos acometidos, é válido investir esforços em verificar se essa proteína pode atuar como potencial biomarcador do LES ou especificamente da nefrite lúpica.

A maioria das proteínas que apresentaram aumento de abundância no LES ativo em relação aos demais grupos, ou seja, proteínas que possuem potencial para atuar como marcadores de atividade da doença, consiste em uma gama de imunoglobulinas do tipo *immunoglobulin light chain variable region*, *immunoglobulin lambda light chain*, *immunoglobulin kappa light chain*. Através de alinhamentos realizados no BLAST, verificamos a homologia entre as sequências de aminoácidos de imunoglobulinas de mesma classe. Alguns alinhamentos evidenciaram diferenças em apenas alguns aminoácidos, outros, diferenças mais pronunciadas, com *gaps* e sequências de aminoácidos diferentes, o que pode indicar um vasto repertório de imunoglobulinas de cadeia leve envolvidas na doença. Sabe-se que alterações gênicas e pós traducionais acarretam elevação sérica de imunoglobulinas do tipo *kappa* e *lambda* no LES, o que, inclusive, está relacionado ao processo de exacerbação da autorreatividade e gravidade das manifestações (DORNER *et al.*, 1999; FRASER *et al.*, 2011; BEZUGLOVA *et al.*, 2012; BOTVINOVCKAYA *et al.*, 2013; ANDREWS *et al.*, 2014). Rana *et al.* (2012), através de abordagem proteômica semelhante, também identificaram aumento da *immunoglobulin kappa light chain variable region* (gl 29836906) em soro de crianças com LES em comparação a crianças saudáveis. De modo semelhante, Oates *et al.* (2005) reportaram excreção urinária aumentada de *immunoglobulin kappa light chain* entre pacientes com nefrite lúpica. Esses dados corroboram nossos achados. Embora seja necessário outras investigações e caracterização das proteínas relatadas, fica claro que são promissoras como potenciais biomarcadores de LES ativo.

Outra proteína que em nosso trabalho apresentou abundância elevada no LES ativo foi a *alpha-2-macroglobulin precursor*, a qual consiste em uma proteína de 1474 aminoácidos codificada pelo gene A2M localizado no cromossomo 12 e que se difere da *alpha-2-macroglobulin* em um único aminoácido (NCBI). Além de mediar o processo inflamatório por meio de ligação a fatores de crescimento, TNF- α e citocinas do tipo IL-1 e IL-8, está associada a diversos processos biológicos entre os quais inibição de proteinases plasmáticas, regulação negativa da ativação do

complemento via lecitina e coagulação sanguínea (UniProt; GO). A elevação sérica de *alpha-2-macroglobulin* em pacientes de LES já foi documentada, sobretudo em sua forma anormalmente glicosilada. Saso *et al.* (1993) demonstraram correlação entre *alpha-2-macroglobulin* anormalmente glicosilada e doenças autoimunes reumatológicas, sugerindo que a glicosilação possa alterar as propriedades antigênicas da proteína e, eventualmente, desencadear a resposta autoimune. Esses achados foram comprovados por Panzironi *et al.*, em 1997, que evidenciaram elevação sérica de *alpha-2-macroglobulin* ligada a resíduos de manose em soro de pacientes com LES ativo. A partir dessas evidências, Cazzola *et al.* (1999) desenvolveram e validaram um ELISA para diagnóstico de LES utilizando anticorpos monoclonais anti-*alpha-2-macroglobulin*. Em nosso trabalho, *alpha-2-macroglobulin precursor* apresentou abundância aumentada no LES ativo para todas as comparações realizadas, confirmando dados da literatura de que seja um importante marcador de atividade da doença.

Por outro lado, nossas análises evidenciaram seis proteínas diferencialmente abundantes entre LES e não LES, sem, entretanto, serem diferencialmente abundantes entre as formas ativa e inativa da doença. As proteínas *chain A*, *Structure Of Prealbumin, Secondary, Tertiary And Quaternary Interactions Determined By Fourier Refinement At 1.8 Angstroms* e sua forma mutante *Chain A, An Engineered Transthyretin Monomer That Is Non-Amyloidogenic - Unless Partially Denatured*, ambas identificadas nos spots 117 e 171, possuem 15KDa e se diferenciam em apenas 2 aminoácidos (BLAKE *et al.*, 1978; JIANG *et al.*, 2001). Consistem na cadeia A da prealbumina, proteína tetramérica também denominada transtirretina (TTR), a qual é encontrada fisiologicamente no soro e líquido e possui a função de transporte plasmático de tiroxina e retinol (UniProt; GO). O aumento de abundância dessa proteína no LES, observada em nosso trabalho, não foi surpreendente, uma vez que já foi relatada em estudos prévios que utilizaram proteômica 2DE convencional e identificação por espectrometria MALDI-ToF/ToF para triagem de biomarcadores no sangue de pacientes com LES (VARGHESE *et al.*, 2007; RANA *et al.*, 2012; KAZEMIPOUR *et al.*, 2015). A presença de níveis patológicos de TTR sugere que pacientes com LES possuem o potencial em desenvolver amiloidose secundária, já que a TTR é sabidamente associada a doenças amiloidogênicas como amiloidose sistêmica senil, polineuropatia amiloidótica familiar e cardiomiopatia amiloidótica familiar (UniProt).

Outra proteína mais abundante no LES em relação a não LES foi *immunoglobulin alpha-2 chain - fragment (Igα2)*. As imunoglobulinas A (IgA) são a primeira linha de defesa em superfícies de mucosa. Estudos prévios tem indicado a presença de dois tipos de genes alfa localizados no cromossomo 14: alfa 1 e alfa 2, sendo que o gene alfa 2 existe em duas formas alotípicas: alfa 2m(1) e alfa 2m(2) (NCBI). A sequência peptídica identificada em nosso trabalho se assemelha com a que é codificada pelo gene alfa 2m(2); no entanto, Chintalachavuru *et al.* (1994) sugerem que tenha sido codificada por um gene mutado ou proveniente de conversão gênica entre os dois alelos alfa. Leong & Ding (2014) discutiram o papel das IgA séricas em contraste com as IgA de mucosa e descreveram as novas interações IgA-proteínas, a influência da glicosilação nas funções normais da imunoglobulina e o possível papel da IgA como regulador de processos autoimunes. Um estudo recente sugere que essas imunoglobulinas exerçam papel tanto anti quanto pró-inflamatório (OLAS *et al.*, 2005). Funções da IgA incluem regulação da produção de citocinas, função de células efetoras e homeostase, sendo importantes no LES (OLAS *et al.*, 2005; UniProt). Estudos histológicos de pele, rim e vasos sanguíneos de pacientes com LES ativo tem revelado, através de imunofluorescência, deposição de IgA nesses tecidos, o que tem sido correlacionado à severidade do acometimento daquele órgão (LUO *et al.*, 2013). A presença de autoanticorpos IgA como anticardiolipina e anti-β2-glycoproteína1 tem sido relacionada à predisposição para eventos protrombóticos no LES (MEHRANI & PETRI, 2011). Considerando-se o exposto, propomos a investigação da *immunoglobulin alpha-2 chain – fragment* como potencial biomarcador do LES e de sua implicação na fisiopatologia da doença.

Por fim, *retinol-binding protein 4 isoform X1*, codificada pelo gene RBP4, localizado no cromossomo 10, consta no NCBI como uma proteína predita por anotação de gene e com comprovação apenas da existência de mRNA, até então. A *retinol binding protein 4* (RBP4) é responsável pelo transporte de retinol do fígado para os tecidos periféricos. No plasma, o complexo RBP-retinol interage com a TTR impedindo a sua perda por filtração glomerular (UniProt; GO). Excreção urinária de RBP foi observada entre pacientes com nefrite lúpica e sua quantificação foi proposta com forma de detectar precocemente acometimento renal no LES, sobretudo em crianças (SESSO *et al.*, 1994; MARKS *et al.*, 2005; VARGHESE *et al.*, 2007). Por outro lado, Rana *et al.*, (2012), através de estratégia proteômica 2D-PAGE convencional, repor-

taram a identificação de RBP no soro de crianças com LES como achado qualitativo, uma vez que o *spot* correspondente a essa proteína estava ausente no gel de indivíduos saudáveis.

Embora RBP já tenha sido mencionada como um potencial marcador do LES, a RBP4 ainda não foi; assim, nosso trabalho reporta, pela primeira vez, o aumento de RBP4 isoforma X1. Alinhamentos realizados no BLAST entre essa isoforma e outras RBP4 evidenciam considerável homologia, observando-se diferenças pontuais entre alguns aminoácidos. RBP4 participa de processos biológicos importantes como regulação positiva da secreção de imunoglobulinas, indução de inflamação em células endoteliais, resistência à insulina, dentre outros (UniProt; FARJO *et al.*; 2012; JIALAU *et al.*, 2014). Essas evidências despertam para a necessidade de investigações futuras acerca da participação da *retinol-binding protein 4 isoform X1* na fisiopatologia do LES e a maior abundância dessa proteína no LES em relação aos grupos não LES demonstra que possui um grande potencial em se tornar biomarcador dessa doença, cujo diagnóstico é tão complexo.

O presente trabalho empregou, pela primeira vez, a técnica 2D-DIGE para identificar potenciais biomarcadores do LES capazes de distinguir, laboratorialmente, LES ativo e LES inativo de indivíduos saudáveis e portadores de outras doenças autoimunes que possuem manifestações clínicas e laboratoriais semelhantes ao LES. Os resultados obtidos foram imensamente satisfatórios, pois, além de ter permitido corroborar o aumento de determinadas proteínas previamente relatadas por outros autores, (como *alpha-1-acid glycoprotein 1 / Orosomuroid 1*, *Zn-alpha2-glycoprotein*, *AMBP preproprotein*, *alpha-1-acid glycoprotein*, *apolipoprotein A-IV precursor*, *immunoglobulin kappa light chain*, *alpha-2-macroglobulin, chain A*, *Structure Of Prealbumin* e *immunoglobulin alpha-2 chain - fragment (Igα2)*), também possibilitou a proposição inédita de dois potenciais biomarcadores específicos do LES: *retinol-binding protein 4 isoform X1* e *SP-40,40 partial*. Tendo em vista os processos biológicos aos quais se relacionam, explorar a participação dessas proteínas na fisiopatologia da doença pode, adicionalmente, contribuir para mais esclarecimentos acerca do LES. Deve-se salientar que este trabalho é um estudo preliminar e outros estudos complementares são recomendados para a confirmação e validação desses resultados.

7 CONCLUSÃO

Foi possível comparar o perfil de proteínas séricas diferencialmente abundantes entre indivíduos com LES e sem LES.

Cinco proteínas previamente descritas como potenciais biomarcadores do LES não foram selecionadas como *spots* com diferença de intensidade entre indivíduos com LES e outras doenças autoimunes, sugerindo o potencial para atuar como biomarcadores de doenças inflamatórias ou autoimunes de modo geral.

Quarenta proteínas apresentaram maior abundância no LES ativo em relação aos demais grupos, com potencial em atuar como biomarcadores de atividade da doença.

Seis proteínas apresentaram aumento simultâneo no LES ativo e LES inativo em relação aos grupos não LES, sugerindo o potencial em diferenciar LES de não LES.

Duas proteínas apresentaram aumento de abundância no LES ativo e inativo em relação ao controle e em LES ativo em relação a outras doenças autoimunes, o que requer mais critérios na validação dessas como marcadores específicos do LES.

Dentre as proteínas identificadas, *retinol-binding protein 4 isoform X1* e *SP-40,40 partial* foram propostas pela primeira vez como potenciais biomarcadores do LES.

8 PERSPECTIVAS

Ampliar o painel de amostras utilizadas, recrutando pacientes em múltiplos centros.

Realizar técnica complementar, como Western-Blot, para reforçar a diferença de abundância das proteínas candidatas nas amostras.

Avaliar a antigenicidade das proteínas frente aos soros de pacientes com LES.

REFERÊNCIAS

ADKINS, N.J.; VARNUM, S.M.; AUBERRY, K.J.; MOORE, R.J.; ANGELL, N.H.; SMITH, R.D.; SPRINGER, D.L.; POUNDS, J.G. Toward a Human Blood Serum Proteome. Analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. **Molecular & Cellular Proteomics**. v.1,n.12, p. 947-955, 2002.

AHEARN, J.M.; LIU, C.C; KAO, A.H.; MANZI, S. Biomarkers for systemic Lupus Erythematosus. **Translational Research**. v.159, n.4, p.326-342, 2012.

ALARCÓN, G.S.; McGWIN, G.; PETRI, M.; REVEILLE, J.D.; RAMSEY-GOLDMAN, R.; KIMBERLY, R.P. Baseline characteristics of a multiethnic Lupus cohort: PROFILE. **Lupus**. v.11, p.95-101, 2002.

AMERICAN COLLEGE OF REUMATOLOGY. The 1982 revised criteria for classification of Systemic Lupus Erythematosus. Disponível em: <http://www.rheumatology.org/practice/clinical/classification/SLE/sle.asp>. <acesso em 30/10/2013>

AMIN, B.; MAURER, A.; VOELTER, W.; MELMS, A.; KALBACHER, H. New Potential Serum Biomarkers in Multiple Sclerosis Identified by Proteomic Strategies. **Current Medicinal Chemistry**. v.21, n.13, p.1544-1556, 2014.

ANDREWS, S.F.; ZHANG, Q.; LIM, S.; LI, L.; LEE, J.H.; ZHENG, N.Y.; HUANG, M.; TAYLOR, W. M.; FARRIS, A.D.; NI, D.; MENG, W.; LUNING, PRAK, E.T.L.; WILSON, P.C. Global analysis of B cell selection using an immunoglobulin light chain-mediated model of autoreactivity. **J Exp Med**. v.210, n.1, p.125–142, 2014.

BADOT, V.; LUIJTEN, R.K.M.A.C.; van ROON, J.A.; DEPRESSEUX, G.; AYDIN, S.; van den EYNDE, B.J.; HOUSSIAU, F.A.; LAUWERYS, B.R. Serum soluble interleukin 7 receptor is strongly associated with Lupus Nephritis in patients with systemic Lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**. v.72, p.453–456, 2013.

Bertsias, G.; Cervera, R.; Boumpas, D.T. Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis and Clinical Features. In: **EULAR Textbook on Rheumatic Diseases**. 5.ed. Vol.5. EULAR: Kilchberg, Zurich, 2012. p.476-505. Disponível em:

http://www.eular.org/myUploadData/files/sample%20chapter20_mod%2017.pdf <acesso em 20/10/2013>

BEZERRA, E.L.M.; PEREIRA-VILAR, M.J.; BARBOSA, O.F.C.; SANTOS, S.Q.; CASTRO, M.A.; TRINDADE, M.C.; SATO, E.I. Systemic Lupus Erythematosus (SLE): Clinical and Laboratory Profile of Patients Followed at the Onofre Lopes University Hospital (UFRN - Natal/Brazil) and Early Organ Damage in Patients with Recently Diagnosed Disease. **Rev Bras Reumatol**, v.45, n.6, p.339-342, 2005.

BEZUGLOVA, A.M.; KONENKOVA, L.P.; BUNEVA, V.N.; NEVINSKYY, G.A. IgGs containing light chains of the λ - and κ - type and of all subclasses (IgG1-IgG4) from the sera of patients with systemic lupus erythematosus hydrolyze myelin basic protein. **Int Immunol**. v.24, n.12, p. 759-770, 2012.

BLAKE, C.C.F.; GEISOW, M.J.; OATLEY, S.J. Structure of Prealbumin: Secondary, Tertiary and Quaternary Interactions Determined by Fourier Refinement at 1.8 Angstroms. **J. Mol. Biol.** v.121, p. 339-356, 1978.

BOMBARDIER, C.; GLADMAN, D.D.; UROWITZ, M.B. *et al.* Derivation of the SLE-DAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. **Arthritis Rheum** v.35, N.6, P.630–640, 1992.

BOTVINOVCKAYA, A.V.; KOSTRIKINA, I.A.; BUNEVA, V.N.; NEVINSKY. Systemic lupus erythematosus: molecular cloning of several recombinant DNase monoclonal kappa light chains with different catalytic properties. **Journal of Molecular Recognition**. v.26, n.10, p. 450-460, 2013.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. **Tietz Fundamentos de química clínica**. Tradução da 6ª ed., Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2008.

CAZZOLLA, N.; SASO, L.; GRIMA, J.; LEONE, M.G.; GRIPPA, E.; CHENG, C.Y.; SILVESTRINI. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Using a Monoclonal Antibody Against α 2-Macroglobulin, for the Diagnosis of Systemic Lupus Erythematosus. **Clinical Biochemistry**. v.32, n.4, p.249–255, 1999.

CECCARELLI, F.; PERRICONE, C.; MASSARO, L.; CIPRIANO, E.; ALESSANRI, C.; SPINELLI, F.R.; VALESINI, G.; CONTI, F. Assessment of disease activity

in Systemic Lupus Erythematosus: Lights and shadows. **Autoimmun Rev.** v.14, n.7, p.601-608.

CHAUHAN, A.K.; MOORE, T.L. Presence of plasma complement regulatory proteins clusterin (Apo J) and vitronectin (S40) on circulating immune complexes (CIC). **Clinical and Experimental Immunology.** v. 145, p. 398–406, 2006.

CHINTALACHARUVU, K.R.; RAINES, M.; MORRISON, S.L. Divergence of human alpha-chain constant region gene sequences. A novel recombinant alpha 2 gene. **J Immunol.** v. 152, n.11, p. 5299-5304, 1994.

CHOI, J.; KIM, S.T.; CRAFT, J. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus – an update. **Curr Opin Immunol.** v.24, n.6, p. 651–657, 2012.

CHOI-MIURA, N.H.; TAKAHASHI, Y.; NAKANO, Y.; TOBE, T.; TOMITA, M. Identification of the disulfide bonds in human plasma protein SP-40,40 (apolipoprotein-J). **J Biochem.** V.112,n.4, p.557-561, 1992.

DAI, Y.; HU, C.; HUANG, Y.; HUANG, H.Y.; LIU, J.; LV, T. A proteomic study of peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus. **Lupus.** v.17, p.799-804., 2008.

DOOLEY, M.A.; ARANOW, C.; GINZLER, E.M. Review of ACR renal criteria in Sytemic Lupus Erythematosus. **Lupus.** v.13, p.857–860, 2004.

DORNER, T.; HEIMBACHER, C.; FARNER, N.L.; LISPSKY, P.E. Enhanced mutational activity of Vkappa gene rearrangements in systemic lupus erythematosus. **Clin Immunol.** v.92, n.2, p.188-196, 1999.

DRUCKER, E.; KRAPPENBAUER, K. Pitfalls and limitations in translation from biomarker discovery to clinical utility in predictive and personalised medicine. **The EPMA Journal.** v.4,n.7, p.1-10, 2013.

DUTSCHMANN, L.A. Systemic Lupus Erythematosus: some historical aspects. **Points of View Medicina Interna.** v.13, n 2, p.133-140, 2006.

DUTTA, M.; SUBRAMANI, E.; CHAUDHURY, K.; TAUNK, K.; GAJBHIYE, A.; PENDHARKAR, N.; DHALI, S.; RAPOLE, S.; SEAL, S.; RAY, C.D.; LODH, I.;

CHAKRAVARTY, B.; DASGUPTA, S. Investigation of serum proteome alterations in human endometriosis. **Journal of Proteomics**. v. 114, p. 182-196, 2005.

ELSHOURBAGY, N.A.; WALKER, D.W.; PAI, Y.K.; BOGUSKI, M.S.; FREEMANE, M.; GORDON, J.I.; TAYLOR, J.M. Structure and Expression of the Human Apolipoprotein A-IV Gene. **The Journal of Biological Chemistry**. v.262, n.17, p.7973-7981, 1987.

FARJO, K.M.; FARJO, R.A.; HALSEY, S.; MOISEYEV, G.; MA, J.X. Retinol-binding protein 4 induces inflammation in human endothelial cells by an NADPH oxidase- and nuclear factor kappa B-dependent and retinol-independent mechanism. **Mol Cell Biol**. v. 32, n.24, p. 5103-5115, 2012.

FRASER, L.; COPE, A.; D'CRUZ, D.; SPENCER, J. Immunoglobulin light chain allelic exclusion in Systemic Lupus Erythematosus. **Immunology**. v.135, p. 168-168, 2011.

FREIRE, E.A.M.; SOUTO, L.M.; CICONELLI, R.M. Assessment measures in Systemic Lupus Erythematosus. **Rev. Bras. Reumatol**. v.51, n.1, p.75-80, 2011.

GE-Healthcare – Isoelectric Focusing (IEF), 2012. Disponível em: <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/pt/GELifeSciences/products/isoelectric-focusing-ief> <acesso em 01/11/2013>

GE-Healthcare – Protein Sample Preparation – Handbook, 2010. Disponível em: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314807262343/litdoc28988741_20141229005535.pdf <acesso em 21/06/2015>

GLADMAN, D.; UROWITZ, M. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Systemic Lupus Erythematosus Guidelines. Guidelines for referral and management of systemic Lupus erythematosus in adults. **Arthritis Rheum**. v.42, p.1785–1796, 1999.

GLADMAN, D.D.; ILBANEZ, D.; UROVITZ M.B. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. **J Rheumatol** . v.29, n.2, p. 288–291, 2002.

GOLDBLATT, F.; O'NEILL, S.G. Clinical aspects of autoimmune rheumatic diseases. **Autoimmune Rheumatic Diseases 1**. v.382, p.398-808, 2013.

GOOD, D.M.; THONGBOONKERD, V.; NOVAK, J.; BASCANDS, J.L.; SCHANSTRA, J.P.; COON, J.J.; DOMINICZAK, A.; MISCHAKI, H. Body Fluid Proteomics for Biomarker Discovery: Lessons from the Past Hold the Key to Success in the Future. **Journal of Proteome Research**. v.6, p 4549–4555, 2007.

GÖRG, A.; KLAUS, A.; LÜCK, C.; WEILAND, F.; WEISS, W. Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients for Proteome Analysis. **Technische Universität München**, 2007.

GRANDER, J.; SIDDIQUI, J.; COPELAND, S.; REMICK, D. Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. **Proteomics**. v.5 ,p. 4713–4718, 2005.

HAHN, B.H; McMAHON, M.A.; WILKINSON, A. *et al.* American College of Rheumatology Guidelines for Screening, Treatment, and Management of Lupus Nephritis. **Arthritis Care & Research**. v.64, n.6, p.797–808, 2012.

HEYWOOD, W.E.; MMADGETT, T.E.; WANG, D.; WALLINGTON, A.; HOGG, J.; MILLS, K.; AVENT, N.D. 2D DIGE analysis of maternal plasma for potential biomarkers of Down Syndrome. **Proteome Science**. v.9, n.56, p. 1-10, 2011.

HOCHBERG, M.C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis Rheum**. v.40, n.9, p.1725.

HUANG, Z.; SHI, Y.; CAI, B.; WANG, L.; WU, Y.; YING, B.; QIN, L; HU, C.; LI, Y. MALDI-TOF MS combined with magnetic beads for detecting serum protein biomarkers and establishment of boosting decision tree model for diagnosis of systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**. v.48, p.626–631, 2009.

INÊS, L.; DUARTE, C.; SILVA, R.S.; TEIXEIRA, A.S.; FONSECA, F.P.; SILVA, A.P. Identification of clinical predictors of flare in Systemic Lupus Erythematosus patients: a 24-month prospective cohort study. **Reumatology**. p.54-58, 2013.

JEKINS, M.; FLYNN, A.; SMART, T.; HARBRON, C.; SABIN, T.; RATNAYAKE, J. *et al.* PSI Biomarker Special Interest Group. A statistician's perspective on biomarkers in drug development. **Pharm Stat**. v.10, p.494–507, 2011.

JIALAU, J.; ADAMS-HUET, B.; DUONG, F.; SMITH, G. Relationship between retinol-binding protein-4/adiponectin and leptin/adiponectin ratios with insulin resistance and inflammation. **Metab Syndr Relat Disord**. v. 12, n.4, p.227-230, 2014.

JIANG, X.; SMITH, C.S.; PETRASSI, H.M.; HAMMARSTROM, P.; WHITE, J.T.; SACCHETTINI, J.C.; KELLY, J.W. An engineered transthyretin monomer that is non-amyloidogenic, unless it is partially denatured. **Biochemistry**. v.40, n.38, p. 11442-11452, 2001.

KAZEMIPOUR, N.; QAZIZADEH, H.; SEPEHRIMANESH, M.; SALIMI, S. Biomarkers identified from serum proteomic analysis for the differential diagnosis of systemic lupus erythematosus. **Lupus**. v.24, p. 582-587, 2015.

KHAN, A.; PACKE, N.H. Simple Urinary Sample Preparation for Proteomic Analysis. **Journal of Proteome Research**. v.5, p.2824-2838, 2006.

KNEPPER, M.A. Proteomics and the kidney. **J Am Soc Nephrol**. v.13, p.1398-1408, 2002.

KORTE, E.A.; GAFFNEY, P.M.; POWELL, D.W. Contributions of mass spectrometry-based proteomics to defining cellular mechanisms and diagnostic markers for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Res Ther**. v.14, n.1., p.1-11, 2012.

MEHRANI, T.; PETRI, M. Association of IgA Anti-beta2 glycoprotein I with clinical and laboratory manifestations of systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol**. v.38, p.64–68, 2011

LEONG, K.W.; DING, J.L. The unexplored roles of human serum IgA. **DNA Cell Biol**. v.33, n.12, p. 823-829, 2014.

LI, W.G.; YE, Z.Z.; YIN, Z.H.; ZHANG, K.. Clinical and immunological characteristics in 552 systemic lupus erythematosus patients in a southern province of China. **International Journal of Rheumatic Diseases**. p.1-8, 2015.

LIU, Z.; DAVIDSON, A. Taming lupus—a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. **Nature Medicine**. v.18,n.6, p. 871-882, 2012.

LUO, Y.J.; TAN, G.Z.; YU, M.; LI, K.W.; LIU, Y.Y.; GUO, Q.; ZENG, F.Q. WANG, L.

Correlation of cutaneous immunoreactants in lesional skin with the serological disorders and disease activity of systemic lupus erythematosus. **Plos One**. v.8, n.8, 2013.

MARKS, S.D.; SHAH, V.; PILKINGTON, C.; WOO, P. DILLON, M.J. Renal tubular dysfunction in children with systemic lupus erythematosus. **Pediatr Nephrol**. v.20, n. 2, p.141-148, 2005.

MAROUGA, R.; DAVID, S.; HAWKINS, E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. **Anal Bioanal Chem**. v.382, p. 669–678, 2005.

MISCHAK, H.; KOLCH, W.; AIVALOTIS, M.; BOUYSSIE, D. *et al*. Comprehensive human urine standards for comparability and standardization in clinical proteome analysis. **Proteomics Clin. Appl**. v. 4, p.464–478, 2010.

MOSLEY, K.; TAM, F.W.K.; EDWARDS, R.J.; CROZIER, J.; PUSEY, C.D.; LIGHTSTONE, L. Urinary proteomic profiles distinguish between active and inactive Lupus Nephritis. **Rheumatology**. v.45, p.1497–1504, 2006.

NAKASHIMA, C.A.K.; GALHARDO, A.P.; DA SILVA, J.F.M.; FIOREZZANO, G.R.; DOS SANTOS, A.B.S.; LEITE, M.F.S.; NOGUEIRA, M.A.; MENOLLI, P.V.S.; MENOLLI, R.A. Incidência e aspectos clínico-laboratoriais do lúpus eritematoso sistêmico em cidade do Sul do Brasil. **Rev Bras Reumatology**. v.51, n.3, p.231-239, 2011.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Banco de Dados. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> <último acesso em 23/08/2015>

NEUROFF, V.; AROLD, N.; TAUBE, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of protein in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**. v.9, p.255-262, 1988.

OATES, J.C.; VARGHESE, S.; BLAND, A.M.; TAYLOR, T.P., SELF, S.E.; STANISLAUS, R., ALMEIDA J.S; ARTHUR, J.M. Prediction of urinary protein markers in Lupus Nephritis. **Kidney Int**. v. 68, n.6, p. 2588-2592, 2005.

O'FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J Biol Chem.** v.250, n.10, p.4007-4021, 1975.

OLAS, K.; BUTTERWECK, H.; TESCHNER, W.; SCHWARZ, H.P.; REIPERT, B.M. Immunomodulatory properties of human serum immunoglobulin A: anti-inflammatory and pro-inflammatory activities in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells. **Clinical and Experimental Immunology.** v.140, p.478-490, 2005.

OUYANG, X.; DAI, Y.; WEN, J.L.; WANG, L.X. ¹H NMR-based metabolomic study of metabolic profiling for Systemic Lupus Erythematosus. **Lupus.** v.20, p.1411–1420, 2011.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature.** v.405, n.6788, p. 837-846, 2000.

PANZIRONI, C.; SILVESTRINI, B.; MO, M.Y.; LAHITA, R.; MRUK, D.; CHENG, C.Y. An increase in the carbohydrate moiety of α 2-macroglobulin is associated with systemic lupus erythematosus (SLE). **Biochemistry and Molecular Biology International.** v.43, n.6, p.1305-1322, 1997.

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

PERKINS, D.N.; PAPPIN, D.J.; CREASY, D.M.; COTRELL, J.S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. **Electrophoresis.** v.20, n.18, p.3551-3567, 1999.

PETRI, M. Epidemiology of Systemic Lupus Erythematosus. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology.** v.16, n.5, p.847-858, 2002.

PETRI, M. Review of classification criteria for Systemic Lupus Erythematosus. **Rheum Dis Clin North Am.** v.31, n.2, p.245-254, 2005.

PETRI, M.; MAGDER, L. Classification criteria for Systemic Lupus Erythematosus: a review. **Lupus.** v.1, p.829–837, 2004.

PETRI, M. *et al.* Derivation and Validation of Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis Rheum.** v.64, n.8, p. 2677–2686, 2012.

PONS-ESTEL, G.J., ALARCON, G.S. SCOFIELD, L. REINLIB, L.; COOPER, G.S. Understanding the epidemiology and progression of Systemic Lupus Erythematosus. **Semin Arthritis Rheum.** v.39, n.4, p.257-268, 2010.

PRICE, E.; WALKER, E. Diagnostic vertigo: The journey to diagnosis in Systemic Lupus Erythematosus. **Health (London)** p.1-17, 2013.

PRIORI, R.; SCRIVO, R.; BRANDT, J.; VALERIO, M.; CASADEI, L.; VALESINI, G.; MANETTI, C. Metabolomics in rheumatic diseases: The potential of an emerging methodology for improved patient diagnosis, prognosis, and treatment efficacy. **Autoimmunity Reviews.** v.12, p.1022-1030, 2013.

RABILLOUD, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. **Journal of Proteomics.** v.74, p.1829-1841, 2011.

RANA, A.; MINZ, R.W.; AGGARWAL, R.; SHARMA, S.; PASRICHA, N.; ANANDI, S.; SINGH, S. A comparative proteomic study of sera in pediatric Systemic Lupus Erythematosus patients and in healthy controls using MALDI-TOF-TOF and LC MS–A pilot study. **Pediatric Reumatology.** v.24, p.1-10, 2012.

RAO, L.; LIU, G.; LI, C.; LI, Y.; WANG, Z.; ZHOU, Z.; TONG, S; WU, X. Specificity of anti-SSB as a diagnostic marker for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. **Exp & Therap Med.** v.5, p.1710-1714, 2013.

ROTHER, R.P.; MOJCIK, C.F.; MCCROSKERY, E.W. Inhibition of terminal complement:a novel therapeutic approach for the treatment of systemic lupus erythematosus. **Lupus.** v.13, n.5, p. 328-334, 2005.

ROVIN, B.H.; SONG, H.; BIRMKINGHAM, D.J.; HEBERT, L.A.; YU, C.Y.; NAGARAJA, H.N. Urine Chemokines as Biomarkers of Human Systemic Lupus Erythematosus Activity. **J Am Soc Nephrol.** v.16, p.467-473, 2005.

ROVIN, B.H.; BIRMKNGHAM, D.J ; NAGARAJA, H.N.; YU, C.Y.HEBERT, L.A. Biomarker Discovery in Human SLE Nephritis. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**. v.65, n.3, p.187-193, 2007.

SASO, L.; SILVESTRINI, I. B.; GUGLIELMOTTI, A.; LAHITA, R.; CHENG, Y. Glycosilation of alpha-2-macroglobulin, a non-acute-phase protein, in patients with autoimmune diseases. **Inflammation**. v. 17, n.4, p.465-479, 1993.

SAUMA, M.F.L.C.; NUNES, N.A.C.; LOPES, L.F.M. Estudo retrospectivo das manifestações clínicas e laboratoriais de 104 pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), em Belém, PA, Brasil (1990-1999). **Rev Bras Reumatol**. v.44, n.3, p.192-197, 2004.

SCOFIELD, R.H; OATES, J.C. The Place of William Osler in the Description of Systemic Lupus Erythematosus. **Am J Med Sci**. v.338. n.5, p.409–412, 2009.

SESSO, R.; RETTORI, R.; NISHIDA, S.; SATO, E.; AJZEN, H.; PEREIRA, A.B. Assessment of lupus nephritis activity using urinary retinol-binding protein. **Nephrol Dial Transplant**. v.9, n.4, p. 367-371, 1994.

SHI, T.; SUN, X.; GAO, Y.; FILMORE, T.L.; SCHEPMOES, A.; ZHAO, R.; HE, J.; MOORE, R.J.; KAGAN, J.; RODLAND, K.D.; LIU, T.; LIU, A.Y.; SMITH, R.D.; TANG, K.; CAMP, D.G.; QIAN, W.J. Targeted Quantification of Low ng/mL Level Proteins in Human Serum without Immunoaffinity Depletion. **Journal of Proteome Research**. v.12, p. 3353-3361, 2013.

SIMON, J.C. Lupus erythematosus: Part I: epidemiology, genetics and immunology. **Journal of the German Society of Dermatology**. p.709-718, 2013.

SKARE, T; DAMIN, R.; HOFIUS, R. Prevalence of the American College of Rheumatology hematological classification criteria and associations with serological and clinical variables in 460 systemic lupus erythematosus patients. **Rev Bras Hematol Hemoter**. v. 2, n.37, p. 115-119.

SMITH-BOUVIER, D.L.; DIVEKAR, A.A.; SASIDHAR, M.; TIWARI-WOODRUFF, S.K.; KING,J.K.; ARNOLD, A.P.; SINGH, R.R.; VOSKUHL. A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. **J Exp Med**.

v.205, p.1099-1108, 2008.

SOMPARN, P.; HIRANKAM, N.; LEELAHAVANICHKUL, A.; KHOVIDHUNKIT, W., THONGBOONKERD, V.; AVIHINGSANON, Y. Urinary proteomics revealed prostaglandin H2D-isomerase, not Zn- α 2-glycoprotein, as a biomarker for active Lupus Nephritis. **Journal of proteomics**. v.75, p.3240-3247, 2012.

SQUATRITO, D.; EMMI, G.; SILVESTRI, E.; CIUCCIARELLI, L.; D'ELIOS, M.M.; PRISCO, D.; EMM, L. Pathogenesis and potential therapeutic targets in systemic lupus erythematosus: from bench to bedside. **Autoimmun Highlights**. v.5, p. 33–45, 2014.

SRIVASTAVA, R.; RAY, S.; VAIBHAV, V.; GOLLAPALLI, K.; JHAVERIB, T.; TAUR, S.; DHALI, S.; GOGTAY, N.; THATTE, U.; SRIKANTH, R.; SRIVASTAVA, S. Serum profiling of leptospirosis patients to investigate proteomic alterations. **Journal of Proteomics**. v.76, p.56-68, 2012.

SUN, L.; CHEN, H.; HU, C.; WANG, P.; LI, Y.; XIE, J.; TANG, F.; BA, D.; ZHANG, X.; HE, W. Identify biomarkers of neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry combined with weak cation magnetic beads. **J Rheumatol**. v.38, n.3, p.454-461, 2011.

SUZUKI, M.; WIERS, K.; BROOKS, E.B.; GREIS, K.D.; HAINES, K.; KLEINGITELMAN, M.S.; OLSON, J.; ONEL, K.; O'NEILL, K.M.; SILVERMAN, E.D.; TUCKER, L.; YING, J.; DEVARAJAN, P.; BRUNNER, H.I. Initial Validation of a Novel Protein Biomarker Panel for Active Pediatric Lupus Nephritis. **Pediatr Res**. v.65, n.5, p.530–536, 2009.

TAN, E.M. COHEN A.S. FRIES, J.F.; MASI, A.T.; McSHANE, D.J.; ROTHFIELD, N.F.; SCHALLER, J.G.; TALAJ, N.; WINCHESTER, R.J. The 1982 revised criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis Rheum**. v.25, p.1271-1277, 1982.

THANOOU, A.; MERRILL, J.T. Top 10 Things to Know About Lupus Activity Measures. **Curr Rheumatol Rep**. v.15, n.334, p.1-7, 2013.

THONGBOONKERD, V.; CHUTIPONGTANATE, S.; KANLAYA, R. Systematic evaluation of sample preparation methods for gel-based human urinary proteomics: quantity, quality and variability. **Journal of Proteome Research**, v.5, p.183-191, 2006.

TOBE, T.; MINOSHUMA, S.; YAMASE, S.; CHOI, N.H.; TOMITA, M.; SHIMIZU, N. Assignment of a human serum glycoprotein SP-40,40 gene (CLI) to chromosome 8. **Cytogenet Cell Genet**. v.57, n.4, p.193-195, 1991.

TSOKOS, G.C. Systemic Lupus Erythematosus. **N Engl J Med**. v.365, n.22, p.2110–2121, 2011.

UniProt – Universal Protein Resource. Banco de Dados. Disponível em: <http://www.uniprot.org/> <último acesso em 22/08/2015>

ÜNLÜ, M.; MORGAN, M.W.; MINDEN, J.S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. **Electrophoresis**. v.18,p. 2071–2077, 1997.

URIBE, A.G.; VILÁ, L.M.; MCGWIN, G.J.; SANCHEZ, M.L.; REVEILLE, J.D.; ALÁRCÓN, G.S. The Systemic Lupus Activity Measure-revised, the Mexican Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI), and a modified SLEDAI-2K are adequate instruments to measure disease activity in systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol**. v.31, n.10, p. 1934-1940, 2004.

VARGHESE, S.A.; POWELL, T.B.; BUDISAVLJEVIC, M.N. *et al.* Urine biomarkers predict the cause of glomerular disease. **J Am Soc Nephrol**. v.18, n.3, p.913-922, 2007.

WATSON, L.; MIDGLEY, A.; PILKINGTON, C.; TULLUS, K.; MARKS, S.D.; HOLT, R.C.L.; JONES, C.A.; BERESFORD, M.W. Urinary monocyte chemoattractant protein 1 and alpha 1 acid glycoprotein as biomarkers of renal disease activity in juvenile-onset systemic lupus erythematosus. **Lupus**. v.12, p. 496-501, 2012.

WEENING, J.J; D’GATI, V.D.; SCHWART, M.M.; SESHAN, S.V.; ALPERS, C.E.; BALLOW, J.E.; BRUIIN, J.A.; COOK, T.; FERRARIO, F.; FOGO, A.B. GINZLER, E.M.;

HEBERT, L.; HILL, P.; JANNETTE, J.C. *et al.* The classification of glomerulonephritis in Systemic Lupus Erythematosus revisited. **Kidney Int.** v.65, p.521–530, 2004.

WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C.; GOOLEY, A.A.; APPEL, R.D.; HUMPHERY-SMITH, I. HOCHSTRASSER, D.F.; WILLIAMS, K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnol Genet Eng Rev.** v.13, p.19-50, 1996.

WU, T.; MOHAN, C. Proteomic tool box for autoimmunity research. **Autoimmunity reviews.** v.8, p.595-598, 2009.

WU, J.; CHEN, Y.D.; GU, W. Urinary proteomics as a novel tool for biomarker discovery in kidney diseases. **J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol).** v.11, n.4, p.227-237, 2010.

YEE, C.S; McELHONE, K.; TEH, L.S.; GORDON, C. Assessment of disease activity and quality of life in Systemic Lupus Erythematosus - New aspects. **Best Pract & Res Clin Rheumatol.** v.23, n.4, p.457-467, 2009.

ZHANG, X.; JIN, M.; WU, H.; NADASDY, T.; HARRIS, N.; GREEN-CHURCH, K.; NAGAJARA, H.; BIRMINGHAM, D.J.; YU, C.Y.; HEBERT, L.A.; ROVIN, B.H. Biomarker Discovery for Lupus Nephritis Through Longitudinal Urine Proteomics. **Kidney Int.** v.74, n.6, p.799–807, 2008.

ZHOU, X.; LI, J.; WANG, L.; WANG, C.; WU, R.; LI, R. Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry in the genetic basis of Systemic Lupus Erythematosus and the complicating kidney injury. **Chin Med J.** v.126, n.15, p.2821-2825, 2013.

ANEXO I: - Índice de atividade utilizado no LES, SLEDAI-2K modificado (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index)

	Presença	Manifestações clínicas	Descrição
8	<input type="checkbox"/>	Convulsão	Início recente, excluídas causas metabólicas infecciosas e secundárias ao uso de drogas.
8	<input type="checkbox"/>	Psicose	Distúrbio severo da percepção da realidade, excluídas causas metabólicas e drogas. Incluem alucinações, incoerência, perda marcada das associações de ideias, pensamento pobre, ilógico; comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico.
8	<input type="checkbox"/>	Síndrome cerebral orgânica	Alteração abrupta e flutuante das funções mentais, atingindo a orientação, a atenção, a memória e outras funções intelectuais. Inclui a redução da vigília, com diminuição da atenção, acompanhada de pelo menos dois sintomas descritos a seguir – perturbação da percepção, discurso incoerente, insônia ou hipersonia diurna, aumento ou redução da atividade psicomotora. Exclui causas metabólicas, infecciosas ou secundárias ao uso de drogas.
8	<input type="checkbox"/>	Distúrbios visuais	Alteração da retina caracterizada por corpos cistóides, hemorragias retinianas, exsudatos serosos ou hemorragias do plexo coroide ou neurite óptica. Excluir hipertensão, infecções e drogas.
8	<input type="checkbox"/>	Comprometimento	Neuropatia sensorial ou motora, de início ou reinício recente.
8	<input type="checkbox"/>	Cefaleia lúpica	Severa e persistente, do tipo enxaqueca que não responde a analgésicos convencionais.
8	<input type="checkbox"/>	AVC	Presença de AVC. Excluir causa aterosclerótica.
8	<input type="checkbox"/>	Vasculite	Ulcerações, gangrenas, infartos periungueais, nódulos digitais dolorosos, áreas hemorrágicas subungueais, biópsia ou angiografia de qualquer área do corpo apresentando vasculite.
4	<input type="checkbox"/>	Artrites	Envolvimento de duas ou mais articulações com sinais e sintomas de inflamação (palpação dolorosa, tumefação ou derrame articular).
4	<input type="checkbox"/>	Miosites	Dor ou fraqueza muscular proximal acompanhada de aumento de CPK/aldolase, eletromiografia alterada, biópsia compatível com
4	<input type="checkbox"/>	Cilindros	Hemáticos, granulosos ou eritrocitários.
4	<input type="checkbox"/>	Hematúria	Mais de 5 eritrócitos/campo. Excluir outras causas tais como litíase renal ou infecções.
4	<input type="checkbox"/>	Proteinúria	Concentração > a 0,5 g/24 horas.
4	<input type="checkbox"/>	Piúria	Mais de 5 leucócitos/campo na ausência de infecção
2	<input type="checkbox"/>	Rash cutâneo	Início recente ou recorrente, caráter inflamatório.
2	<input type="checkbox"/>	Alopecia	Início recente ou recorrente, excessiva, difusa ou localizada de perda de cabelo.
2	<input type="checkbox"/>	Úlcera de	Início recente ou recorrente de úlceras nasais ou orais
2	<input type="checkbox"/>	Pleurite	Dor pleurítica com atrito, derrame ou espessamento pleural.
2	<input type="checkbox"/>	Pericardite	Dor no peito, com atrito ou derrame pericárdico, confirmado por eletrocardiograma.
1	<input type="checkbox"/>	Febre	Temperatura axilar >38°, na ausência de processo infeccioso.
1	<input type="checkbox"/>	Trombocitopenia	Concentração de plaquetas inferior a 100 000/mm ³ (excluídas causas farmacológicas).
1	<input type="checkbox"/>	Leucopenia	Concentração de leucócitos inferior a 3 000/mm ³ (excluídas causas farmacológicas).

_____ Soma total dos pontos

ANEXO II: Critérios do American College of Rheumatology (ACR) para diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistêmico - 1997.

Critério	Definição
1. Rash malar	Eritema constante, plano ou elevado, sobre as eminências malares, tendendo para os sulcos nasolabiais
2. Rash discoide	Aumento de manchas eritematosas com descamação queratoide e tamponamento folicular; cicatrizes atróficas podem ocorrer em lesões mais antigas
3. Fotossensibilidade	Erupção cutânea por reação anormal à exposição à luz solar, seja por relato do paciente ou observação médica.
4. Úlcera oral	Ulceração oral ou nasofaríngea, geralmente indolor, observada por médico.
5. Artrite	Artrite não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, associada à hipersensibilidade, tumefação e derrame.
6. Serosite	a) Pleurite—convincente histórico de dor pleurítica, ou atrito ouvido pelo médico ou evidência de derrame pleural. <i>OU</i> b) Pericardite — documentada por ECG, ou atrito ou evidência de derrame pericárdico.
7. Distúrbio renal	a) Proteinúria persistente maior que 0,5g por dia ou maior que 3+ se não for realizada quantificação. <i>OU</i> b) Cilindros celulares – podendo ser hemático, granular, tubular ou misto.
8. Distúrbio neurológico	a) Convulsões – na ausência de drogas tóxicas ou distúrbios metabólicos conhecidos; ex. uremia, cetoacidose ou desbalanço eletrolítico. <i>OU</i> b) Psicose—na ausência de drogas tóxicas ou distúrbios metabólicos conhecidos; ex. uremia, cetoacidose ou desbalanço eletrolítico.
9. Distúrbio hematológico	a) Anemia hemolítica—com reticulocitose <i>OU</i> b) Leucopenia— total menor que 4.000/mm ³ em duas ou mais ocasiões <i>OU</i> c) Linfopenia— menor que 1.500/mm ³ em duas ou mais ocasiões <i>OU</i> d) Trombocitopenia—menor que 100.000/mm ³ na ausência de drogas tóxicas.
10. Distúrbios imunológicos	a) Presença de anticorpos anti-fosfolípides <i>OU</i> b) Anti-DNA: anticorpo anti-DNA nativo em títulos anormais <i>OU</i> c) Anti-Sm: presença de anticorpos anti-Sm <i>OU</i> d) Testes sorológicos falso-positivos para sífilis por pelo menos 6 meses e confirmado por FTA-abs negativo.
11. Anticorpo antinuclear	Título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência ou teste equivalente em qualquer momento na ausência de drogas que sabidamente estão associadas com o Lúpus induzido.

ANEXO III: Critérios do *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) para o diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Critérios clínicos do SLICC

Critério	Definição
1. Lúpus cutâneo agudo incluindo erupção malar (não considerar se erupção malar discoide)	Lúpus bolhoso; necrólise epidérmica tóxica variante do lúpus; erupção lúpica maculopapular; erupção lúpica fotossensível (na ausência de dermatomiosite) ou lúpus cutâneo subagudo (lesões psoríaseformes não endurecidas e/ou lesões anulares policíclicas que resolvem sem deixar cicatrizes, embora ocasionalmente com despigmentação pós-inflamatória ou telangiectasias).
2. Lúpus cutâneo crônico incluindo erupção discoide clássica	Lesões localizadas (abaixo do pescoço) e generalizadas (acima e abaixo do pescoço); lúpus hipertrófico (verrucoso); paniculite lúpica (profunda); lúpus mucoso; lúpus eritematoso túmido; frieiras lúpicas; lúpus discoide / líquen plano se sobrepõem.
3. Úlceras orais	Úlceras no palato, boca, língua ou úlcera nasa (na ausência de outras causas como vasculites, infecções (herpes), doença inflamatória do intestino, artrite reativa, e alimentos ácidos).
4. Alopecia não cicatricial	Fragilidade capilar ou queda difusa (na ausência de outras causas, como alopecia areata, drogas, deficiência de ferro e alopecia androgênica alopecia).
5. Sinovite	Envolvendo duas ou mais articulações, caracterizada por edema ou efusão ou sensibilidade em duas ou mais articulações e trinta minutos ou mais de rigidez matinal.
6. Serosite	Pleurisia típica para mais de 1 dia (ou derrames pleurais, ou atrito pleural); dor pericárdica típica (dor com decúbito que melhora ao sentar) por mais de um dia (ou derrame pericárdico, ou atrito pericárdico, ou pericardite pelo ECG) na ausência de outras causas, como infecção, uremia.
7. Distúrbio renal	Proteínas urinárias/creatinina (ou proteinúria de 24h) revelando 500 mg de proteínas/24h OU presença de células vermelhas
8. Distúrbio neurológico	Convulsões; psicoses; formas múltiplas de mononeurite (na ausência de outras causas, como vasculite primária); vasculite; mielite; neuropatia craniana ou periférica (na ausência de outras causas, como vasculite primária, infecção e diabetes melito); confusão mental aguda (na ausência de outras causas, incluindo metabólitos tóxicos, uremia e drogas).
9. Distúrbio hematológico	Anemia hemolítica
10. Distúrbio Hematológico	Leucopenia ($< 4000/\text{mm}^3$) pelo menos uma vez (na ausência de outras causas conhecidas, como drogas e hipertensão portal) OU Linfopenia ($< 1000/\text{mm}^3$) pelo menos uma vez (na ausência de outras causas conhecidas como corticosteróides, drogas e infecção)

11. Distúrbio hematológico	Trombocitopenia ($<100.000/mm^3$) pelo menos uma vez (na ausência de outras causas conhecidas como drogas, hipertensão portal e púrpura trombocitopênica trombótica).
-----------------------------------	---

Critérios imunológicos do SLICC

Critério	Definição
1. ANA	Anticorpos antinucleares acima do valor de referência laboratorial.
2. Anti-dsDNA	Anti-dsDNA acima da faixa de referência do laboratório, exceto E-LISA: duas vezes acima da faixa de referência de laboratório
3. Anti-Sm	Anti-Sm
4. Anticorpo antifosfolípides	Qualquer um dos seguintes: anticoagulante lúpico; RPR falso-positivo; médios ou altos títulos de anticardiolipina (IgA, IgG ou IgM); anti- β 2 glycoproteína I (IgA, IgG or IgM)
5. Sistema do complemento	Baixos níveis de C3, C4, CH50
6. Coombs direto	Teste de Coombs direto na ausência de anemia hemolítica.

ANEXO IV: Folha de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

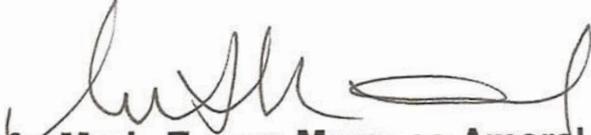
Projeto: CAAE – 01928412.8.0000.5149

**Interessado(a): Profa. Maria das Graças Carvalho
Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 27 de junho de 2012, o projeto de pesquisa intitulado **"Lúpus eritematoso sistêmico: aspectos hematológicos e imunológicos"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


**Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

APÊNDICE A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de amostras biológicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

BANCO DE DADOS E DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DESTINADO AO ESTUDO DE PARÂMETROS GENÉTICOS, BIOQUÍMICOS, HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS RELACIONADOS A DOENÇAS AUTOIMUNES.

Projeto de pesquisa:

“Lupus eritematoso sistêmico: aspectos hematológicos e imunológicos”

Prezado(a) Senhor(a),

O Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais está realizando um estudo em amostras de sangue de pacientes com “Lúpus Eritematoso Sistêmico”. Este estudo tem como objetivo a obtenção de conhecimentos importantes sobre esta doença, podendo facilitar, no futuro, o tratamento. Os dados clínicos e laboratoriais que serão obtidos nesta pesquisa poderão ajudar o médico a entender melhor esta doença.

As informações obtidas nesta pesquisa poderão não lhe trazer benefícios imediatos, mas poderão trazer benefícios para outros indivíduos com a mesma doença no futuro.

Se você quiser participar desta pesquisa, poderá fazê-lo doando uma amostra de 15mL de sangue para realizarmos exames laboratoriais. A retirada da pequena amostra de sangue poderá lhe causar um leve desconforto proveniente da picada da agulha e o local onde se coletou o sangue pode ficar roxo.

Caso você não queira participar desta pesquisa não haverá qualquer prejuízo no seu tratamento. Toda informação obtida nessa pesquisa será mantida em segredo. Sua amostra de sangue deverá fazer parte de um banco de dados e de amostras biológicas que poderão ser utilizadas no futuro para novas pesquisas. Todas as informações e amostras receberão um código de modo que ninguém saberá que esta amostra é sua, com exceção dos pesquisadores deste projeto. No entanto, qualquer pesquisa futura com o seu sangue deverá ser aprovada por um comitê de ética, sem necessidade de contactar você.

Qualquer outra informação sobre esta pesquisa poderá ser obtida com a pesquisadora principal Professora Maria das Graças Carvalho (31-34096881) ou com o médico reumatologista responsável Dr. Paulo Madureira de Pádua (31-32265581).

Desde já, agradecemos a sua colaboração!

Termo de consentimento

Declaro que, após convenientemente esclarecido(a) pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, autorizo a coleta de 15mL de sangue para ser utilizado na pesquisa acima.

Nome completo

Assinatura

____ / ____ / ____
Data

Para contato:

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa Av. Antônio Carlos, 6627
Unidade Administrativa II - 2º andar
Sala 2005
Campus Pampulha
Belo Horizonte, MG - Brasil

APÊNDICE B: Proteínas identificadas por spot, seus gi e aumento de abundância para as comparações realizadas. C: controle; O: outras doenças autoimunes; A: LES ativo; I: LES inativo.

Grupo comparado		Spot	Proteína	gi
↑abundância no controle				
A	I	O		
		2	kininogen-1 isoform 2 precursor	gi 4504893
		4	serum albumin	gi 28592
		5	serum albumin	gi 28592
		6	serum albumin	gi 28592
		7	serum albumin	gi 28592
		8	serum albumin	gi 28592
		9	serum albumin	gi 28592
		10	serum albumin	gi 28592
			immunoglobulin mu heavy chain, partial	gi 390994295
		11	unnamed protein product RecName: Full=Ig mu heavy chain disease protein; Alt-Name: Full=BOT	gi 33451 gi 127506
			immunoglobulin mu heavy chain, partial	gi 390994295
		12	unnamed protein product RecName: Full=Ig mu heavy chain disease protein; Alt-Name: Full=BOT	gi 33451 gi 127506
			immunoglobulin mu heavy chain, partial	gi 390994295
		13	unnamed protein product RecName: Full=Ig mu heavy chain disease protein; Alt-Name: Full=BOT	gi 33451 gi 127506
			RecName: Full=Alpha-2-HS-glycoprotein; AltName: Full=Alpha-2-Z-globulin; AltName: Full=Ba-alpha-2-glycoprotein; AltName: Full=Fetuin-A; Contains: Rec-Name: Full=Alpha-2-HS-glycoprotein chain A; Contains: RecName: Full=Alpha-2-HS-glycoprotein chain B;	gi 112910
		14		
			RecName: Full=Alpha-2-HS-glycoprotein; AltName: Full=Alpha-2-Z-globulin; AltName: Full=Ba-alpha-2-glycoprotein; AltName: Full=Fetuin-A; Contains: Rec-Name: Full=Alpha-2-HS-glycoprotein chain A; Contains: RecName: Full=Alpha-2-HS-glycoprotein chain B;	gi 112910
		15		
			haptoglobin precursor	gi 306882
		19	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
		20	haptoglobin precursor	gi 306882
			haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
		23	serum albumin	gi 28592

24	serum albumin	gi 28592																								
			26	serum albumin	gi 28592																					
						28	haptoglobin precursor	gi 306882																		
									28	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762															
												29	haptoglobin alpha2	gi 229323												
															29	haptoglobin precursor	gi 306882									
																		29	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762						
																					30	haptoglobin alpha2	gi 229323			
																								30	haptoglobin precursor	gi 306882
31	serum albumin	gi 28592																								
			32	kininogen-1 isoform 2 precursor	gi 4504893																					
						33	kininogen-1 isoform 2 precursor	gi 4504893																		
									34	kininogen-1 isoform 2 precursor	gi 4504893															
												36	serum albumin	gi 28592												
															37	serum albumin	gi 28592									

↑abundância em Outras doenças autoimunes

A	C	I											
40	41	42	43	44	45	47	49	51	52	53	54		
												serum albumin	gi 28592
												afamin precursor	gi 4501987
												afamin precursor	gi 4501987
												afamin precursor	gi 4501987
												Chain B, Complement C4 In Complex With Masp-2	gi 401871712
												complement C4B precursor	gi 1314244
												serum albumin	gi 28592
												haptoglobin precursor	gi 306882
												haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
haptoglobin precursor	gi 306882												
haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762												
haptoglobin precursor	gi 306882												
haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762												
haptoglobin alpha2	gi 229323												
haptoglobin precursor	gi 306882												
haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762												
haptoglobin alpha2	gi 229323												
haptoglobin precursor	gi 306882												
haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762												
haptoglobin alpha2	gi 229323												
Chain A, Crystal Structure Of Cleaved Human Alpha1-antichymotrypsin At 2.7 Angstroms Resolution And Its Comparison With Other Serpins	gi 443345												
unnamed protein product	gi 193787435												
Chain A, Cleaved Antichymotrypsin T345r	gi 2982165												

55	Chain A, Crystal Structure Of Cleaved Human Alpha1-antichymotrypsin At 2.7 Angstroms Resolution And Its Comparison With Other Serpins	gi 443345	
		unnamed protein product	gi 193787435
		Chain A, Cleaved Antichymotrypsin T345r	gi 2982165
		haptoglobin precursor	gi 306882
		haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
		haptoglobin precursor	gi 306882
		haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
		haptoglobin precursor	gi 306882
		haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
		haptoglobin precursor	gi 306882
56	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762	
		unnamed protein product	gi 29446
57	Chain B, Human Hemoglobin D Los Angeles: Crystal Structure	gi 169791771	
		beta globin chain	gi 66473265
		beta globin chain variant	gi 26892090
58	hemoglobin beta chain	gi 66731527	
		Chain B, Crystal Structure Of Human Hemoglobin E At 1.73 A Resolution	gi 46014946
59	Chain A, Structure Of Haemoglobin In The Deoxy Quaternary State With Ligand Bound At The Alpha Haems	gi 229751	
		beta-globin	gi 179409
60	serum albumin	gi 28592	
		serum albumin	gi 28592
61	kininogen-1 isoform 2 precursor	gi 4504893	
		kininogen-1 isoform 2 precursor	gi 4504893
62	kininogen-1 isoform 2 precursor	gi 4504893	
		Ig L-chain V-region	gi 27552515
63	Chain A, Crystal Structure Of Cleaved Human Alpha1-antichymotrypsin At 2.7 Angstroms Resolution And Its Comparison With Other Serpins	gi 443345	
		unnamed protein product	gi 193787435
64	Chain A, Cleaved Antichymotrypsin T345r	gi 2982165	
		haptoglobin precursor	gi 306882
65	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762	
		haptoglobin precursor	gi 306882
66	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762	
		haptoglobin precursor	gi 306882
67	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762	
		haptoglobin precursor	gi 306882
68	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762	
		unnamed protein product	gi 29446

↑ abundância em LES ativo

C	O	I		
70	alpha-2-macroglobulin precursor	gi 177870		
		gi 177870		
71	Chain A, Crystal Structure Of Cleaved Human Alpha1-antichymotrypsin At 2.7 Angstroms Resolution And Its Comparison With Other Serpins	gi 443345		
		unnamed protein product	gi 193787435	
72	Chain A, Cleaved Antichymotrypsin T345r	gi 2982165		
		haptoglobin precursor	gi 306882	
73	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762		
		haptoglobin precursor	gi 306882	
74	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762		
		haptoglobin precursor	gi 306882	
75	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762		
		haptoglobin precursor	gi 306882	
76	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762		
		unnamed protein product	gi 29446	

77	Chain A, Crystal Structure Of Cleaved Human Alpha1-antichymotrypsin At 2.7 Angstroms Resolution And Its Comparison With Other Serpins	gi 443345
	unnamed protein product	gi 193787435
	Chain A, Cleaved Antichymotrypsin T345r	gi 2982165
78	Chain A, Crystal Structure Of Cleaved Human Alpha1-antichymotrypsin At 2.7 Angstroms Resolution And Its Comparison With Other Serpins	gi 443345
	unnamed protein product	gi 193787435
	Chain A, Cleaved Antichymotrypsin T345r	gi 2982165
79	Chain A, Crystal Structure Of Cleaved Human Alpha1-antichymotrypsin At 2.7 Angstroms Resolution And Its Comparison With Other Serpins	gi 443345
	unnamed protein product	gi 193787435
	Chain A, Cleaved Antichymotrypsin T345r	gi 2982165
80	Chain A, Crystal Structure Of Cleaved Human Alpha1-antichymotrypsin At 2.7 Angstroms Resolution And Its Comparison With Other Serpins	gi 443345
	unnamed protein product	gi 193787435
	Chain A, Cleaved Antichymotrypsin T345r	gi 2982165
81	Chain A, Crystal Structure Of Cleaved Human Alpha1-antichymotrypsin At 2.7 Angstroms Resolution And Its Comparison With Other Serpins	gi 443345
	unnamed protein product	gi 193787435
82	antitrypsin alpha1 mutant	gi 224224
	Ig alpha-2 chain - human (fragment)	gi 2135473
83	hypothetical protein	gi 34365085
	Chain I, P14-Fluorescein-N135q-S380c-Antithrombin-lii antithrombin III variant	gi 8569387
	Ig alpha-2 chain - human (fragment)	gi 2135473
84	hypothetical protein	gi 34365085
	Chain I, P14-Fluorescein-N135q-S380c-Antithrombin-lii antithrombin III variant	gi 8569387
85	serum albumin	gi 576554
86	serum albumin	gi 28592
	serotransferrin precursor	gi 28592
87	Chain A, Apo-Human Serum Transferrin (Non-Glycosylated)	gi 4557871
	Chain A, Human Serum Transferrin, Recombinant N-Terminal Lobe, Apo Form	gi 110590597
90	RecName: Full=Alpha-1-acid glycoprotein 1; Short=AGP 1; AltName: Full=Orosomucoid-1; Short=OMD 1; Flags: Precursor	gi 4389230
	Orosomucoid 1	gi 112877
	protein,alpha1 acid glyco	gi 219519923
		gi 229386

	RecName: Full=Alpha-1-acid glycoprotein 1; Short=AGP 1; AltName: Full=Orosomucoid-1; Short=OMD 1; Flags:	gi 112877
91	Precursor Orosomucoid 1	gi 219519923
	protein,alpha1 acid glyco	gi 229386
92	leucine-rich alpha-2-glycoprotein precursor	gi 16418467
93	haptoglobin precursor	gi 306882
	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
94	haptoglobin precursor	gi 306882
	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
95	haptoglobin precursor	gi 306882
	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
96	haptoglobin precursor	gi 306882
	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
97	Zn-alpha2-glycoprotein	gi 38026
98	haptoglobin precursor	gi 306882
	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
99	haptoglobin precursor	gi 306882
	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
100	apolipoprotein A-IV precursor	gi 178757
101	SP40,40, partial	gi 338305
102	protein AMBP preproprotein	gi 4502067
	immunoglobulin kappa 1 light chain	gi 170684606
	Chain A, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of A Human Monoclonal Igm Cold Agglutinin	gi 10835792
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669331
	Chain L, Structure Of The 1121b Fab Fragment	gi 344189783
	Chain L, Tr1.9 Fab Fragment Of A Human Igg1 Kappa Autoantibody	gi 1633496
	immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684576
	immunoglobulin VH_5c kappa chain	gi 339272253
	immunoglobulin light chain	gi 149673891
	immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684484
	Chain L, Crystal Structure Of Li33 Igg1 Fab	gi 291191169
103	Chain L, 48g7 Hybridoma Line Fab Complexed With Hapten 5-(Para- Nitrophenyl Phosphonate)-Pentanoic Acid	gi 157877246
	Chain C, An Antibody Against The C-terminal Domain Of Pcsk9 Lowers Ldl Cholesterol Levels In Vivo	gi 491668788
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669377
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669389
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669347
	immunoglobulin light chain	gi 194173415
	immunoglobulin light chain	gi 194173385
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669317
	monoclonal IgM antibody light chain	gi 41388186
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669373

	immunoglobulin kappa-chain VK-1, partial	gi 185925
	immunoglobulin light chain kappa, partial	gi 444737639
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669321
	immunoglobulin variable region	gi 323432584
	immunoglobulin variable region	gi 323432988
	immunoglobulin variable region	gi 323433034
	immunoglobulin variable region	gi 323432838
	IgG L chain	gi 524453553
	Chain C, Solution Structure Of Human Immunoglobulin M	gi 166007160
	unnamed protein product	gi 16554039
	Ig L-chain V-region	gi 27552515
	Ig lambda chain V region - human	gi 478602
104	Unknown (protein for MGC:31936)	gi 18044241
	immunoglobulin lambda light chain VLJ region	gi 21669493
	Chain L, Fab Fragment In Complex With Small Molecule	
	Hapten, Crystal Form-1	gi 164519439
	immunoglobulin lambda 1 light chain	gi 170684488
	pre-serum amyloid P component	gi 337758
	immunoglobulin kappa 1 light chain	gi 170684606
105	Chain A, Crystal Structure Of Lipid-Free Human Apolipo-	
	protein A-I	gi 90108664
	lipoprotein Gln I	gi 229479
	immunoglobulin kappa 1 light chain	gi 170684606
	Chain A, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of A	
	Human Monoclonal Igm Cold Agglutinin	gi 10835792
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669331
	Chain L, Structure Of The 1121b Fab Fragment	gi 344189783
	Chain L, Tr1.9 Fab Fragment Of A Human Igg1 Kappa	
	Autoantibody	gi 1633496
	immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684576
	immunoglobulin VH_5c kappa chain	gi 339272253
	immunoglobulin light chain	gi 149673891
	immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684484
	Chain L, Crystal Structure Of Li33 Igg1 Fab	gi 291191169
106	Chain L, 48g7 Hybridoma Line Fab Complexed With	
	Hapten 5-(Para- Nitrophenyl Phosphonate)-Pentanoic	gi 157877246
	Acid	
	Chain C, An Antibody Against The C-terminal Domain Of	
	Pcsk9 Lowers Ldl Cholesterol Levels In Vivo	gi 491668788
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669377
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669389
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669347
	immunoglobulin light chain	gi 194173415
	immunoglobulin light chain	gi 194173385
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669317
	monoclonal IgM antibody light chain	gi 41388186
	immunoglobulin kappa-chain VK-1, partial	gi 185925

	immunoglobulin light chain kappa, partial	gi 444737639
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669321
	immunoglobulin variable region	gi 323432584
	immunoglobulin variable region	gi 323432988
	immunoglobulin variable region	gi 323433034
	immunoglobulin variable region	gi 323432838
	IgG L chain	gi 524453553
	immunoglobulin kappa light chain variable region, partial	gi 453071236
	immunoglobulin rearranged light chain	gi 2072280
	immunoglobulin heavy chain variable region, partial	gi 388778203
	This CDS feature is included to show the translation of the corresponding V_region. Presently translation qualifiers on V_region features are illegal, partial	gi 561701
	Chain B, The Crystal Structure Of Pcsk9 In Complex With 1d05 Fab	gi 310942619
	immunoglobulin kappa 1 light chain	gi 156633244
	immunoglobulin kappa 1 light chain	gi 170684606
	Chain A, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of A Human Monoclonal Igm Cold Agglutinin	gi 10835792
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669331
	Chain L, Structure Of The 1121b Fab Fragment	gi 344189783
	Chain L, Tr1.9 Fab Fragment Of A Human Igg1 Kappa Autoantibody	gi 1633496
	immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684576
	immunoglobulin VH_5c kappa chain	gi 339272253
	immunoglobulin light chain	gi 149673891
	immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684484
	Chain L, Crystal Structure Of Li33 Igg1 Fab	gi 291191169
	Chain L, 48g7 Hybridoma Line Fab Complexed With Hapten 5-(Para- Nitrophenyl Phosphonate)-Pentanoic Acid	gi 157877246
107	Chain C, An Antibody Against The C-terminal Domain Of Pcsk9 Lowers Ldl Cholesterol Levels In Vivo	gi 491668788
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669377
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669389
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669347
	Chain C, Solution Structure Of Human Immunoglobulin M unnamed protein product	gi 166007160
	Ig L-chain V-region	gi 16554039
	Ig lambda chain V region - human	gi 27552515
	Unknown (protein for MGC:31936)	gi 478602
	immunoglobulin lambda light chain VLJ region	gi 18044241
	Chain L, Fab Fragment In Complex With Small Molecule Hapten, Crystal Form-1	gi 21669493
	pre-serum amyloid P component	gi 164519439
	immunoglobulin kappa 1 light chain	gi 337758
	immunoglobulin kappa 1 light chain	gi 170684606

Chain A, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of A Human Monoclonal Igm Cold Agglutinin	gi 10835792
immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669331
Chain L, Structure Of The 1121b Fab Fragment	gi 344189783
Chain L, Tr1.9 Fab Fragment Of A Human Igg1 Kappa Autoantibody	gi 1633496
immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684576
immunoglobulin VH_5c kappa chain	gi 339272253
immunoglobulin light chain	gi 149673891
immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684484
Chain L, Crystal Structure Of Li33 Igg1 Fab	gi 291191169
Chain L, 48g7 Hybridoma Line Fab Complexed With Hapten 5-(Para- Nitrophenyl Phosphonate)-Pentanoic Acid	gi 157877246
Chain C, An Antibody Against The C-terminal Domain Of Pcsk9 Lowers Ldl Cholesterol Levels In Vivo	gi 491668788
immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669377
immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669347
immunoglobulin light chain	gi 194173415
immunoglobulin light chain	gi 194173385
immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669317
monoclonal IgM antibody light chain	gi 41388186
immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669373
immunoglobulin kappa-chain VK-1, partial	gi 185925
immunoglobulin light chain kappa, partial	gi 444737639
immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669321
immunoglobulin variable region	gi 323432584
immunoglobulin variable region	gi 323433034
IgG L chain	gi 524453553
Chain C, Solution Structure Of Human Immunoglobulin M	gi 166007160
unnamed protein product	gi 16554039
Ig L-chain V-region	gi 27552515
Ig lambda chain V region - human	gi 478602
Unknown (protein for MGC:31936)	gi 18044241
immunoglobulin lambda light chain VLJ region	gi 21669493
Chain L, Fab Fragment In Complex With Small Molecule Hapten, Crystal Form-1	gi 164519439
immunoglobulin lambda 1 light chain	gi 170684488
immunoglobulin kappa light chain V-Jk4	gi 507342
immunoglobulin light chain variable region	gi 75707373
immunoglobulin light chain variable region	gi 8176546
immunoglobulin light chain variable region	gi 9295287
immunoglobulin kappa light chain variable region	gi 98956376
immunoglobulin kappa chain variable region	gi 109240666
immunoglobulin light chain variable region	gi 16923209
immunoglobulin light chain variable region, partial	gi 237702364
immunoglobulin kappa chain variable region	gi 15722775

	immunoglobulin kappa 1 light chain	gi 170684606
	Chain A, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of A Human Monoclonal Igm Cold Agglutinin	gi 10835792
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669331
	Chain L, Structure Of The 1121b Fab Fragment	gi 344189783
	Chain L, Tr1.9 Fab Fragment Of A Human Igg1 Kappa Autoantibody	gi 1633496
	immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684576
	immunoglobulin VH_5c kappa chain	gi 339272253
	immunoglobulin light chain	gi 149673891
	immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684484
109	Chain L, Crystal Structure Of Li33 Igg1 Fab	gi 291191169
	Chain L, 48g7 Hybridoma Line Fab Complexed With Hapten 5-(Para- Nitrophenyl Phosphonate)-Pentanoic Acid	gi 157877246
	Chain C, An Antibody Against The C-terminal Domain Of Pcsk9 Lowers Ldl Cholesterol Levels In Vivo	gi 491668788
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669377
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669389
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669347
	Chain A, Crystal Structure Of Lipid-Free Human Apolipoprotein A-I	gi 90108664
	lipoprotein Gln I	gi 229479
	immunoglobulin kappa 1 light chain	gi 170684606
	Chain A, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of A Human Monoclonal Igm Cold Agglutinin	gi 10835792
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669331
	Chain L, Structure Of The 1121b Fab Fragment	gi 344189783
	Chain L, Tr1.9 Fab Fragment Of A Human Igg1 Kappa Autoantibody	gi 1633496
	immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684576
	immunoglobulin VH_5c kappa chain	gi 339272253
	immunoglobulin light chain	gi 149673891
	immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684484
110	Chain L, Crystal Structure Of Li33 Igg1 Fab	gi 291191169
	Chain L, 48g7 Hybridoma Line Fab Complexed With Hapten 5-(Para- Nitrophenyl Phosphonate)-Pentanoic Acid	gi 157877246
	Chain C, An Antibody Against The C-terminal Domain Of Pcsk9 Lowers Ldl Cholesterol Levels In Vivo	gi 491668788
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669377
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669389
	unnamed protein product	gi 16554039
	Ig L-chain V-region	gi 27552515
	Ig lambda chain V region - human	gi 478602
	Unknown (protein for MGC:31936)	gi 18044241
	immunoglobulin lambda light chain VLJ region	gi 21669493

	Chain L, Fab Fragment In Complex With Small Molecule Hapten, Crystal Form-1	gi 164519439
	immunoglobulin lambda 1 light chain	gi 170684488
	pre-serum amyloid P component	gi 337758
	immunoglobulin kappa 1 light chain	gi 170684606
	Chain A, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of A Human Monoclonal Igm Cold Agglutinin	gi 10835792
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669331
	Chain L, Structure Of The 1121b Fab Fragment	gi 344189783
	Chain L, Tr1.9 Fab Fragment Of A Human Igg1 Kappa Autoantibody	gi 1633496
	immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684576
	immunoglobulin VH_5c kappa chain	gi 339272253
	immunoglobulin light chain	gi 149673891
	immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684484
	Chain L, Crystal Structure Of Li33 Igg1 Fab	gi 291191169
	Chain L, 48g7 Hybridoma Line Fab Complexed With Hapten 5-(Para- Nitrophenyl Phosphonate)-Pentanoic Acid	gi 157877246
	Chain C, An Antibody Against The C-terminal Domain Of Pcsk9 Lowers Ldl Cholesterol Levels In Vivo	gi 491668788
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669377
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669389
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669347
	immunoglobulin light chain	gi 194173415
	immunoglobulin light chain	gi 194173385
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669317
	monoclonal IgM antibody light chain	gi 41388186
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669373
	immunoglobulin kappa-chain VK-1, partial	gi 185925
	immunoglobulin light chain kappa, partial	gi 444737639
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669321
	immunoglobulin variable region	gi 323432584
	immunoglobulin variable region	gi 323432988
	immunoglobulin variable region	gi 323433034
	immunoglobulin variable region	gi 323432838
	IgG L chain	gi 524453553
	Chain C, Solution Structure Of Human Immunoglobulin M unnamed protein product	gi 166007160
	Ig L-chain V-region	gi 16554039
	Ig lambda chain V region - human	gi 27552515
	Unknown (protein for MGC:31936)	gi 478602
	immunoglobulin lambda light chain VLJ region	gi 18044241
	Chain L, Fab Fragment In Complex With Small Molecule Hapten, Crystal Form-1	gi 21669493
	immunoglobulin lambda 1 light chain	gi 164519439
	immunoglobulin kappa light chain V-Jk4	gi 170684488
		gi 507342

111

	Ig kappa chain precursor V-J-C region - human (fragment)	gi 539616
	immunoglobulin kappa 1 light chain	gi 170684606
	Chain A, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of A Human Monoclonal Igm Cold Agglutinin	gi 10835792
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669331
	Chain L, Structure Of The 1121b Fab Fragment	gi 344189783
	Chain L, Tr1.9 Fab Fragment Of A Human Igg1 Kappa Autoantibody	gi 1633496
	immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684576
	immunoglobulin VH_5c kappa chain	gi 339272253
	immunoglobulin light chain	gi 149673891
	immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684484
	Chain L, Crystal Structure Of Li33 Igg1 Fab	gi 291191169
	Chain L, 48g7 Hybridoma Line Fab Complexed With Hapten 5-(Para- Nitrophenyl Phosphonate)-Pentanoic Acid	gi 157877246
112	Chain C, An Antibody Against The C-terminal Domain Of Pcsk9 Lowers Ldl Cholesterol Levels In Vivo	gi 491668788
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669377
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669389
	Chain C, Solution Structure Of Human Immunoglobulin M unnamed protein product	gi 166007160
	Ig L-chain V-region	gi 27552515
	Ig lambda chain V region - human	gi 478602
	Unknown (protein for MGC:31936)	gi 18044241
	immunoglobulin lambda light chain VLJ region	gi 21669493
	Chain L, Fab Fragment In Complex With Small Molecule Hapten, Crystal Form-1	gi 164519439
	immunoglobulin lambda 1 light chain	gi 170684488
	pre-serum amyloid P component	gi 337758
	Ig lambda C	gi 223815
	immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684576
	immunoglobulin light chain	gi 194173415
113	immunoglobulin variable region	gi 323432584
	immunoglobulin variable region	gi 323432988
	Ig lambda chain V region - human	gi 478602
	immunoglobulin lambda 1 light chain	gi 170684488
	IgG L chain	gi 524453553
	Ig lambda chain V region - human	gi 478602
	Unknown (protein for MGC:31936)	gi 18044241
114	immunoglobulin lambda light chain VLJ region	gi 21669493
	immunoglobulin lambda chain variable region	gi 987072
	immunoglobulin lambda chain variable region	gi 587358
	immunoglobulin lambda light chain	gi 219566655
	immunoglobulin lambda light chain variable region	gi 3142594
115	PREDICTED: retinol-binding protein 4 isoform X1	gi 530394088

117	Chain A, Structure Of Prealbumin, Secondary, Tertiary And Quaternary Interactions Determined By Fourier Refinement At 1.8 Angstroms	gi 230651
118	Chain A, An Engineered Transthyretin Monomer That Is Non-Amyloidogenic - Unless Partially Denatured haptoglobin precursor	gi 17942890 gi 306882
119	haptoglobin isoform 1 preproprotein haptoglobin alpha2 haptoglobin precursor	gi 4826762 gi 229323 gi 306882
122	Chain B, Human Hemoglobin D Los Angeles: Crystal Structure beta globin chain beta globin chain variant hemoglobin beta chain	gi 169791771 gi 66473265 gi 26892090 gi 66731527
124	Chain A, Structure Of Haemoglobin In The Deoxy Quaternary State With Ligand Bound At The Alpha Haems beta-globin	gi 229751 gi 179409
126	Ig alpha-2 chain - human (fragment)	gi 2135473
127	angiotensinogen apolipoprotein A-IV precursor	gi 532198 gi 178757
129	SP40,40, partial Chain A, Crystal Structure Of Lipid-Free Human Apolipoprotein A-I lipoprotein Gln I	gi 338305 gi 90108664 gi 229479

↑ abundância em LES inativo

C O A

140	Chain A, Crystal Structure Of Cleaved Human Alpha1-antichymotrypsin At 2.7 Angstroms Resolution And Its Comparison With Other Serpins unnamed protein product	gi 443345 gi 193787435
141	Chain A, Cleaved Antichymotrypsin T345r Chain A, Crystal Structure Of Cleaved Human Alpha1-antichymotrypsin At 2.7 Angstroms Resolution And Its Comparison With Other Serpins unnamed protein product	gi 2982165 gi 443345 gi 193787435
142	Chain A, Cleaved Antichymotrypsin T345r unnamed protein product kininogen-1 isoform 2 precursor	gi 2982165 gi 193787435 gi 4504893
143	Chain A, Crystal Structure Of Cleaved Human Alpha1-antichymotrypsin At 2.7 Angstroms Resolution And Its Comparison With Other Serpins	gi 443345

	unnamed protein product	gi 193787435
	kininogen-1 isoform 2 precursor	gi 4504893
	Chain A, Crystal Structure Of Cleaved Human Alpha1-antichymotrypsin At 2.7 Angstroms Resolution And Its Comparison With Other Serpins	gi 443345
144	unnamed protein product	gi 193787435
	Chain A, Cleaved Antichymotrypsin T345r	gi 2982165
	kininogen-1 isoform 2 precursor	gi 4504893
	Chain A, Crystal Structure Of Cleaved Human Alpha1-antichymotrypsin At 2.7 Angstroms Resolution And Its Comparison With Other Serpins	gi 443345
146	unnamed protein product	gi 193787435
	kininogen-1 isoform 2 precursor	gi 4504893
	Ig alpha-2 chain - human (fragment)	gi 2135473
	hypothetical protein	gi 34365085
	Chain I, P14-Fluorescein-N135q-S380c-Antithrombin-lii	gi 8569387
147	antithrombin III variant	gi 576554
	Ig alpha-2 chain C region - human	gi 70058
	Ig alpha-2 chain C region (allotype A2m(2)) - human (fragment)	gi 87783
	Ig alpha-2 chain - human (fragment)	gi 2135473
	hypothetical protein	gi 34365085
148	Chain I, P14-Fluorescein-N135q-S380c-Antithrombin-lii	gi 8569387
	antithrombin III variant	gi 576554
	Ig alpha-2 chain - human (fragment)	gi 2135473
	hypothetical protein	gi 34365085
149	Ig alpha-2 chain C region - human	gi 70058
	Ig alpha-2 chain C region (allotype A2m(2)) - human (fragment)	gi 87783
	Ig alpha-2 chain - human (fragment)	gi 2135473
	hypothetical protein	gi 34365085
150	Ig alpha-2 chain C region - human	gi 70058
	Ig alpha-2 chain C region (allotype A2m(2)) - human (fragment)	gi 87783
	Ig alpha-2 chain - human (fragment)	gi 2135473
	hypothetical protein	gi 34365085
151	Ig alpha-2 chain C region - human	gi 70058
	Ig alpha-2 chain C region (allotype A2m(2)) - human (fragment)	gi 87783
	Ig alpha-2 chain - human (fragment)	gi 2135473
	hypothetical protein	gi 34365085
152	Ig alpha-2 chain C region - human	gi 70058
	Ig alpha-2 chain C region (allotype A2m(2)) - human (fragment)	gi 87783
153	RecName: Full=Alpha-1-acid glycoprotein 1; Short=AGP 1; AltName: Full=Orosomucoid-1; Short=OMD 1; Flags: Precursor	gi 112877

	Orosomucoid 1	gi 219519923
	protein,alpha1 acid glyco	gi 229386
	RecName: Full=Alpha-1-acid glycoprotein 1; Short=AGP	
	1; AltName: Full=Orosomucoid-1; Short=OMD 1; Flags:	gi 112877
154	Precursor	
	Orosomucoid 1	gi 219519923
	protein,alpha1 acid glyco	gi 229386
155	haptoglobin precursor	gi 306882
	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
156	haptoglobin precursor	gi 306882
	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
157	haptoglobin precursor	gi 306882
	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
158	haptoglobin precursor	gi 306882
	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
159	Zn-alpha2-glycoprotein	gi 38026
160	haptoglobin precursor	gi 306882
	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
162	haptoglobin precursor	gi 306882
	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
163	apolipoprotein A-IV precursor	gi 178757
164	SP40,40, partial	gi 338305
165	protein AMBP preproprotein	gi 4502067
	immunoglobulin kappa 1 light chain	gi 170684606
	Chain A, Crystal Structure Of The Fab Fragment Of A Human Monoclonal Igm Cold Agglutinin	gi 10835792
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669331
	Chain L, Structure Of The 1121b Fab Fragment	gi 344189783
	Chain L, Tr1.9 Fab Fragment Of A Human Igg1 Kappa Autoantibody	gi 1633496
	immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684576
	immunoglobulin VH_5c kappa chain	gi 339272253
	immunoglobulin light chain	gi 149673891
	immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684484
166	Chain L, Crystal Structure Of Li33 Igg1 Fab	gi 291191169
	Chain L, 48g7 Hybridoma Line Fab Complexed With Hapten 5-(Para- Nitrophenyl Phosphonate)-Pentanoic Acid	gi 157877246
	Chain C, An Antibody Against The C-terminal Domain Of Pcsk9 Lowers Ldl Cholesterol Levels In Vivo	gi 491668788
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669377
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669389
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669347
	immunoglobulin light chain	gi 194173415
	immunoglobulin light chain	gi 194173385
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669317
	monoclonal IgM antibody light chain	gi 41388186

	immunoglobulin kappa-chain VK-1, partial	gi 185925
	immunoglobulin light chain kappa, partial	gi 444737639
	immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669321
	immunoglobulin variable region	gi 323432584
	immunoglobulin variable region	gi 323432988
	immunoglobulin variable region	gi 323433034
	immunoglobulin variable region	gi 323432838
	IgG L chain	gi 524453553
168	PREDICTED: retinol-binding protein 4 isoform X1	gi 530394088
	haptoglobin precursor	gi 306882
170	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
	haptoglobin alpha2	gi 229323
171	Chain A, Structure Of Prealbumin, Secondary, Tertiary And Quaternary Interactions Determined By Fourier Re- finement At 1.8 Angstroms	gi 230651
	Chain A, An Engineered Transthyretin Monomer That Is Non-Amyloidogenic - Unless Partially Denatured	gi 17942890
172	haptoglobin precursor	gi 306882
	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
	unnamed protein product	gi 29446
	beta globin chain	gi 66473265
175	beta globin chain variant	gi 26892090
	hemoglobin beta chain	gi 66731527
	Chain B, Crystal Structure Of Human Hemoglobin E At 1.73 A Resolution	gi 46014946
176	RecName: Full=Alpha-2-HS-glycoprotein; AltName: Full=Alpha-2-Z-globulin; AltName: Full=Ba-alpha-2- glycoprotein; AltName: Full=Fetuin-A; Contains: Rec- Name: Full=Alpha-2-HS-glycoprotein chain A; Contains: RecName: Full=Alpha-2-HS-glycoprotein chain B;	gi 112910
177	Chain B, Complement C4 In Complex With Masp-2	gi 401871712
	complement C4B precursor	gi 1314244
	haptoglobin precursor	gi 306882
179	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
	haptoglobin alpha2	gi 229323
	haptoglobin precursor	gi 306882
180	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
	haptoglobin alpha2	gi 229323
	haptoglobin precursor	gi 306882
181	haptoglobin isoform 1 preproprotein	gi 4826762
	haptoglobin alpha2	gi 229323