

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

Karine Silvestre Ferreira

***MARCADORES DE ATIVAÇÃO DA DOENÇA E ESTADO DE
HIPERCOAGULABILIDADE NO LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO***

Belo Horizonte

2017

Karine Silvestre Ferreira

*MARCADORES DE ATIVAÇÃO DA DOENÇA E ESTADO DE
HIPERCOAGULABILIDADE NO LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO*

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial, para obter o grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho

Belo Horizonte

2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas infinitas bênçãos, especialmente de ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho.

À minha mãe Marília e meu pai Joel pelo grande amor, pela companhia constante em todos os momentos da minha vida, pelas palavras de incentivo, pelas palavras que me permitiram melhorar, por sempre me indicar o caminho e me levar a refletir.

A toda minha família e ao meu noivo Luciano, pelo carinho e amor em todos os momentos.

A minha orientadora professora Maria das Graças Carvalho, por tornar possível eu estar aqui hoje, pelo exemplo de dedicação e incentivo tão necessários durante essa jornada. Obrigada por contribuir com minha formação profissional e pessoal. Aprendi muito com você, minha gratidão sempre!

Ao meu co-orientador professor Vicente de Paulo C.P. Toledo pelo apoio e incentivo em diversos momentos. Muito obrigada por tudo professor, serei sempre grata.

A equipe médica da Santa Casa de Belo Horizonte, pelo carinho e pelos bons momentos vivenciados.

Aos meus amigos do laboratório de Hematologia/ ACT- UFMG, pela boa convivência e amizade. Agradeço a todos nunca me esquecerei de vocês!

Agradeço muito às pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, que possibilitaram o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito

(Francisco Cândido Xavier)

Dedico este trabalho aos pacientes com Lúpus e a minha tia Maria Elizabeth Silvestre Alvarenga (in memoriam).

RESUMO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune e inflamatória caracterizada pela produção de diversos autoanticorpos e depósitos teciduais de complexos antígeno-anticorpo circulantes. A descoberta e validação de métodos para determinação de produtos de ativação do complemento ligados a células do sangue (CB-CAPs= *Cell-bound complement activation products*), tais como C4d ligados a reticulócitos (R-C4d) e a plaquetas (P-C4d), como potenciais biomarcadores do estado de atividade e do potencial trombótico do LES, respectivamente, podem ser importantes ferramentas para o melhor entendimento da fisiopatologia e do manejo clínico dessa doença. Outro fator importante na patogênese do LES, são os eventos consequentes a anormalidades do sistema hemostático que necessitam ser melhor entendidos. Dessa forma, o objetivo principal desse estudo foi avaliar se, no LES, os níveis de CB-CAPs podem ser preditores de ativação da doença (R-C4d) e de predisposição trombótica (P-C4d). Além dos níveis de CB-CAPs, investigou-se o potencial trombótico por meio da determinação dos níveis plasmáticos de importantes componentes do sistema hemostático, tais como dímero D (DDi), trombosmodulina (TM), proteína S (PS) e proteína ligadora de C4b (C4BP), buscando-se uma possível associação entre estes parâmetros e os outros investigados. Para alcançar esse objetivo, foram incluídas um total de 60 pacientes com LES, sob tratamento, selecionadas no Serviço de Reumatologia da Santa Casa de Belo Horizonte, sendo 30 pacientes classificadas com doença em baixa atividade (SLEDAI-2K \leq 4) e 30 com a doença em moderada/alta atividade (SLEDAI-2K $>$ 4), enquanto simultaneamente foram selecionadas 30 mulheres sem LES (controles), pareadas por idade e do mesmo nível sócio econômico. As amostras de sangue coletadas das participantes do estudo foram utilizadas para a determinação dos níveis de CB-CAPs por meio da citometria de fluxo e para a obtenção de plasma para a realização dos ensaios previstos neste estudo. Foi observado aumento dos níveis de R-C4d, P-C4d, TM e DDi em pacientes com LES com moderada/alta atividade, cujos níveis correlacionaram com o aumento do índice SLEDAI-2K. Os níveis de PS e C4BP foram semelhantes entre os pacientes com LES moderada/alta atividade, baixa atividade e controles. A análise conjunta dos dados permitiu concluir que níveis elevados de R-C4d e P-C4d correlacionaram com o índice SLEDAI-2K e,

portanto, com piora clínica em pacientes com LES. Além do mais, a combinação de R-C4d e P-C4d permitiu o estabelecimento de uma proposta de *cutoff* como indicativo de doença em atividade. Finalmente, foi possível ainda confirmar a relação entre doença em atividade e estado de hipercoagulabilidade, provavelmente associado à dano endotelial e inflamação.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune and inflammatory disease characterized by the production of various autoantibodies and tissue deposits of circulating antigen-antibody complexes. The discovery and validation of methods for the determination of cell-bound complement activation products (CB-CAPs), such as C4d bound to reticulocytes (R-C4d) and to platelets (P-C4d), as potential biomarkers of the activity state and the thrombotic potential of SLE, respectively, may be important tools for a better understanding of the pathophysiology and clinical management of SLE patients. Another important factor in the pathogenesis of SLE are the events resulting from hemostatic system abnormalities that need to be better understood. Thus, the main objective of this study was to evaluate whether the levels of CB-CAPs in SLE patients can be predictors of disease activity (R-C4d) and thrombotic predisposition (P-C4d). In addition to the CB-CAPs levels, the thrombotic potential was investigated by determining the plasma levels of important components of the hemostatic system such as D-dimer (DDi), thrombomodulin (TM), protein S (PS) and C4b binding protein (C4BP), seeking a possible association between these parameters and the others also investigated. To achieve this goal, a total of 60 patients with SLE, under treatment, selected at the Hospital Santa Casa Rheumatology Service in Belo Horizonte was included, with 30 LES patients classified as having low-disease activity (SLEDAI-2K \leq 4) and 30 patients with moderate/high activity (SLEDAI-2K > 4), while 30 women without SLE (controls), matched by age and socioeconomic status were simultaneously selected. Blood samples collected from the study participants were used to determine the levels of CB-CAPs by means of flow cytometry and to obtain plasma for carrying out the other tests included in this study. Compared to both controls and SLE patients with low activity disease, increased levels of R-C4d, P-C4d, TM and DDi were observed in patients with SLE with moderate/high activity disease, whose levels correlated with the increase in the SLEDAI-2K index. PS and C4BP levels were similar among all three groups. Data analysis showed that high levels of R-C4d and P-C4d correlated with the SLEDAI-2K index and, therefore, with clinical worsening in SLE patients. Moreover, the combination of R-C4d and P-C4d allowed the establishment of a cutoff proposal as indicative of disease activity. Finally, it was possible to confirm the

relationship between disease activity and hypercoagulability, probably associated with endothelial damage and inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR- American College of Rheumatology

BILAG- British Isles Lupus Assessment Group

BLYS- Fator estimulador de linfócitos B

C1- Proteína C1 do complemento

C2- Proteína C2 do complemento

C3- Proteína C3 do complemento

C4- Proteína C4 do complemento

C4BP- C4b- binding protein

C5- Proteína C5 do complemento

C6- Proteína C6 do complemento

C7- Proteína C7 do complemento

C8 - Proteína C8 do complemento

C9- Proteína C8 do complemento

CB-CAPS- Cell –bound complemet activation products

CD4- Cluster of differentiation 4

CD8- Cluster of differentiation 8

CD20- Antígeno de linfócitos B

CH50- Complemento hemolítico total sérico

CIVD- Coagulação intravascular disceminada

DDi- Dímero-D

ECLAM- European Consensus Lupus Activity Measurement

FDA- Food and Drug Administration

FOXP3- Forkhead box P3

FT- Fator tissular

FV- Fator V ativado

FVa- Fator V

FVIII- Fator VIII

FVIIIa- Fator VIII ativado

FX - Fator X

FXa- Fator X ativado

IL-10 - Interleucina 10

IL-16 - Interleucina 16

IL-6- Interleucina 6

LAI- Lupus Activity Index

LES- Lupus eritematoso sistêmico

MAC- Complexo de ataque a membrana

MKLI- Megakaryoblastic leukemia -translocation 1

PC- Proteína C

P-C4d- C4d ligado a plaquetas

PS- *Proteína S*

R-C4d- *C4d ligado a reticulócitos*

SAF- *Síndrome do anticorpo antifosfolípide*

SLAM- *Systemic Lupus Activity Measure*

SLEDAI- *Systemic Lupus Erythematosus Disease*

TEV- *Tromboembolismo Venoso*

TM- *Trombomodulina*

TNF- *Fator de necrose tumoral*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Principais órgãos e sistemas afetados no LES.

FIGURA 2: Diferentes vias de ativação do sistema complemento.

FIGURA 3: Fragmentos do sistema complemento ligados às células sanguíneas.

FIGURA 4: Novo modelo da coagulação baseado em superfícies celulares.

FIGURA 5: Mecanismo da anticoagulação natural mediado pelas proteínas C e S culminando com a proteólise de FVIIa e FVa, dependente do endotélio.

SUMÁRIO

1.0-INTRODUÇÃO.....	15
2.0-REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.0-JUSTIFICATIVA.....	34
4.0-OBJETIVOS.....	36
4.1-OBJETIVO GERAL.....	36
4.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
5.0-DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	37
5.1-CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	37
5.2- OBTENÇÃO DE AMOSTRAS DE SANGUE.....	38
5.3- DETERMINAÇÃO DE CB-C4D (CELL BOUND- C4D) POR CITOMETRIA DE FLUXO (R-C4d e P-C4d).....	39
5.4- DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DA TROMBOMODULINA (TM) E DÍMERO-D (DDI).....	40
5.5-DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE C4BP E PS.....	41
6.0-RESULTADOS.....	42
6.1- LEVELS OF CIRCULATING RETICULOCYTES-C4d: IS THERE LINK TO DISEASE ACTIVITY IN PATIENTS WITH SLE?.....	42

6.2- CELL-BOUND COMPLEMENT ACTIVATION PRODUCTS AS AN USEFUL BIOMARKER FOR SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS ACTIVITY.....	51
6.3- APLICAÇÕES DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.....	73
6.4- CORRELATION BETWEEN ACTIVE DISEASE AND HYPERCOAGULABILITY STATE IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS.....	94
7.0- CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	117
8.0-REFERÊNCIAS	120
ANEXOS.....	126

1.0-INTRODUÇÃO

1.1- Aspectos gerais e fisiopatológicos relacionados ao Lúpus Eritematoso Sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença do tecido conjuntivo, multisistêmica, de característica autoimune podendo ser caracterizada pela produção de diversos autoanticorpos e depósitos teciduais de complexos antígeno-anticorpo circulantes, expressando-se clinicamente de forma heterogênea e que pode acometer diversos órgãos (FIGURA 1). Na etiopatogenia do LES há conjugação de fatores genéticos, ambientais e hormonais que levam à perda do controle do equilíbrio imunológico. O LES pode apresentar manifestações musculoesqueléticas, cutâneo-mucosas, renais, pleuropulmonares, hematológicas, cardiovasculares, neuropsiquiátricas, oculares e manifestações do sistema reticuloendotelial (TELES, et al., 2008).

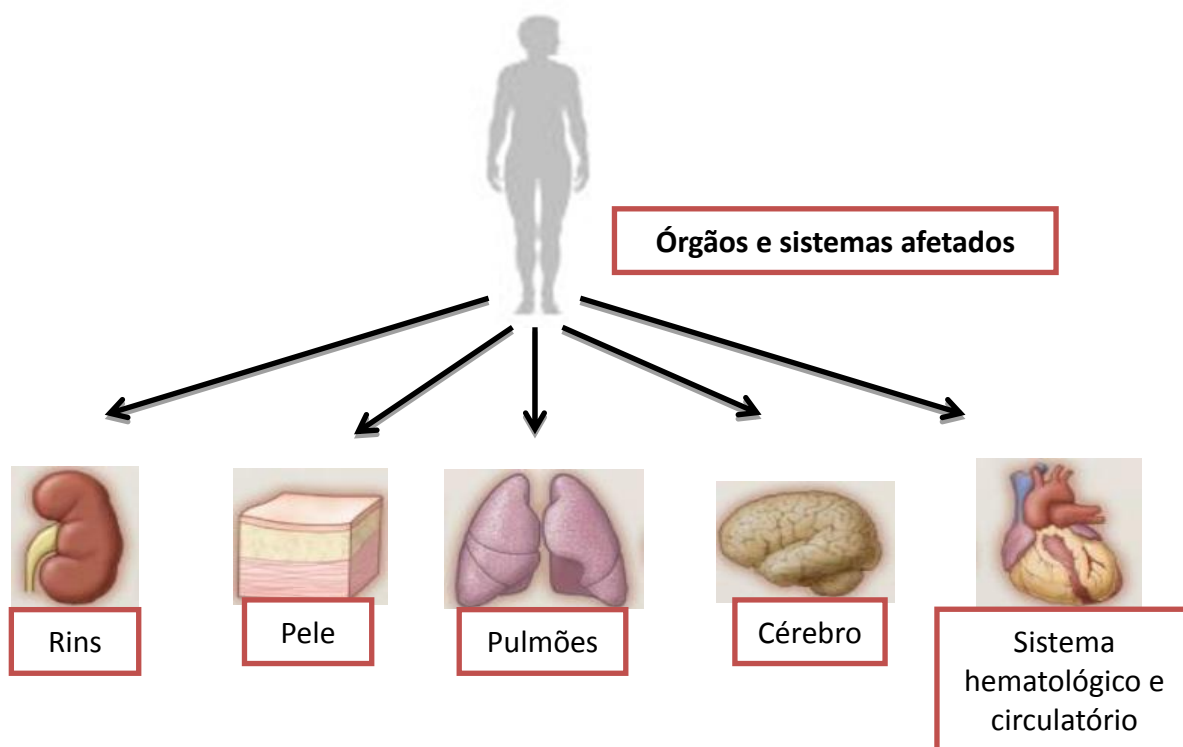


FIGURA 1: Principais órgãos e sistemas afetados no LES. Modificado de TELES, 2008.

O LES possui uma evolução variável, podendo cursar de forma insidiosa ou fulminante, com recorrências e remissões relacionadas a variações individuais, manejo terapêutico e outros fatores ainda desconhecidos (VILAR & SATO, et al., 2002). A nefrite é

conhecida como uma séria complicação do LES e um forte preditor de pior prognóstico. O óbito é diretamente atribuído à insuficiência renal em 67% dos casos de LES (PETRI, 2005). Embora se faça uso de terapias imunossupressoras mais agressivas, 10-25% dos pacientes desenvolvem insuficiência renal terminal, fazendo com que a nefrite lúpica corresponda a 1-2% de todas as causas de insuficiência renal crônica grave (RUS, et al., 2002). De acordo com estudo desenvolvido por Mavragani et al, 2015, em pacientes com idade juvenil, manifestações musculoesqueléticas, hipertensão, aparecimento de anticorpos anti-dsDNA e aumento da contagem global de leucócitos são aspectos relacionados ao desenvolvimento de nefrite lúpica. No exame laboratorial de urina rotina a proteinúria está altamente associada com nefrite proliferativa. A desregulação de fenômenos relacionados à apoptose é um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento do LES. Foi demonstrado que o aumento da citocina inflamatória Interferon pode impedir a depuração celular via apoptose. Em experimento com indução de LES em camundongos, a translocação de células B da zona marginal do baço para a zona marginal rica em macrófagos (responsável pelo *clearance* de corpos apoptóticos) comprometeu a fagocitose de imunocomplexos. A fagocitose de imunocomplexos por macrófagos da zona marginal esplênica requer a completa expressão da proteína codificada pelo gene MKL1 (*megakaryoblastic leukemia -translocation 1*). No entanto, conforme revisado por Adinolfi et al., 2016, foi observado que o interferon tipo I promove uma diminuição da transcrição de MKL1 em macrófagos da zona marginal esplênica. A diminuição da expressão de MLK1 pode levar à incapacidade de fagocitose dos imunocomplexos, tanto em modelo de lúpus murino como em pacientes com LES.

O espectro clínico da doença é extremamente variável entre os pacientes. Foi observado que o perfil clínico e laboratorial encontrado no LES juvenil é completamente diferente do demonstrado no LES adulto e tardio. A idade de início da doença acima de 50 anos foi tida como menor evento de risco associado ao óbito por LES (ADINOLFI, et al., 2016).

2.0-REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Variáveis epidemiológicas

De acordo com Rus et al, 2002 o LES pode ser caracterizado como uma doença eminentemente feminina sendo mais prevalente em mulheres na idade reprodutiva. A maior incidência de LES em mulheres tem sido interpretada como relacionada a fatores hormonais, principalmente ao estrógeno, que parece desempenhar um importante papel na super-expressão de auto-antígenos endógenos e tal fato poderia explicar as diferenças na ocorrência da doença entre ambos os sexos (THERVET, et al., 2003). Os índices de incidência na população em geral variam de 1,0 na Dinamarca para 8,7 no Brasil a cada 100,000 habitantes (THERVET, et al., 2003). Estudos nos Estados Unidos indicam que a incidência e prevalência nos americanos afrodescendentes são duas a três vezes maiores quando comparados aos descendentes europeus. Esse resultado, em conjunto ao de outros estudos, sugere que europeus e seus descendentes tem uma incidência do LES menor que a de outros grupos étnicos (BORCHERS, et al., 2010). Por outro lado, outro estudo epidemiológicos apontam para uma maior prevalência e gravidade da doença na população asiática (JAKES, et al., 2012). No Brasil, poucos estudos epidemiológicos foram realizados na área da Reumatologia. Em relação ao LES, a maioria dos estudos foi realizada nos Estados Unidos ou na Europa (THERVET, et al., 2001). Foi observada uma maior frequência de LES com envolvimento cutâneo em países de regiões tropicais, incluindo o Brasil, possivelmente devida à alta exposição à luz ultravioleta. Os estudos atuais sobre incidência foram feitos com pequeno número de pacientes, o que dificulta uma conclusão definitiva à respeito da incidência do lúpus no Brasil (NAKASHIMA, et al., 2011).

2.2- Diagnóstico, prognóstico e tratamento do LES

O diagnóstico de LES é feito através dos critérios de classificação propostos pelo American College of Rheumatology em 1982 sendo que os mesmos foram revisados em 1997 (HOCHBERG, 1997). O diagnóstico do LES é baseado em parâmetros clínicos e exames laboratoriais compreendendo 11 critérios bem definidos. Se o indivíduo apresentar no mínimo 4 manifestações destes, pode-se, na maioria das vezes, firmar o

diagnóstico de LES. A definição dos critérios da doença foi importante para uniformizar o seu diagnóstico e os estudos científicos. É possível que pacientes com lúpus não apresentem os quatro dos critérios de classificação, principalmente quando apresentam algum anticorpo específico do LES (anti-DNA nativo em títulos moderados/ altos ou anti-Sm) e apenas uma manifestação clínica. Em pacientes que sobrevivem por mais de 10 anos, a causa de morte com frequência não está relacionada com a atividade de doença, e sim com os danos crônicos causados pela doença ou por sua terapêutica. Para a descrição do prognóstico e acompanhamento de pacientes com LES, os pacientes devem ser avaliados para a atividade da doença, danos acumulados durante a doença, como também para a qualidade de vida (FREIRE, et al., 2011).

Quadro 1: Critérios de classificação do LES de acordo com o *American College of Rheumatology* (1997)

- 1. Eritema malar: lesão eritematosa fixa em região malar, plana ou em relevo.**
 - 2. Lesão discoide: lesão eritematosa, infiltrada, com escamas queratóticas aderidas e tampões foliculares, que evolui com cicatriz atrófica e discromia.**
 - 3. Fotossensibilidade: exantema cutâneo como reação não usual a exposição à luz solar, de acordo com a historia do paciente ou observado pelo médico.**
 - 4. Úlceras orais/nasais: úlceras orais ou nasofaríngeas, usualmente indolores, observadas pelo médico.**
 - 5. Artrite: não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, caracterizadas por dor e edema ou derrame articular.**
 - 6. Serosite: pleuris (caracterizada por história convincente de dor pleurítica, atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural) ou pericardite (documentado por eletrocardiograma, atrito ou evidência de derrame pericárdico).**
 - 7. Comprometimento renal: proteinúria persistente (> 0,5 g/dia ou 3+) ou cilindrúria anormal.**
-

8. Alterações neurológicas: convulsão (na ausência de outra causa) ou psicose (na ausência de outra causa).

9. Alterações hematológicas: anemia hemolítica ou leucopenia (menor que 4.000/mm³ em duas ou mais ocasiões) ou linfopenia (menor que 1.500/mm³ em duas ou mais ocasiões) ou plaquetopenia (menor que 100.000/mm³ na ausência de outra causa).

10. Alterações imunológicas: anticorpo anti-DNA nativo ou anti-Sm ou presença de anticorpo antifosfolípide com base em:

a) níveis anormais de IgG ou IgM anticardiolipina;

b) teste positivo para anticoagulante lúpico; ou

c) teste falso-positivo para sífilis, por, no mínimo, seis meses.

11. Anticorpos antinucleares: título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência indireta ou método equivalente, em qualquer época, e na ausência de drogas conhecidas por estarem associadas à síndrome do lúpus induzido por drogas.

Vários índices foram criados e padronizados com o objetivo de mensurar a atividade do LES. Dentre estes, estão o ECLAM (*European Consensus Lupus Activity Measurement*), o LAI (*Lupus Activity Index*), o SLAM (*Systemic Lupus Activity Measure*), o BILAG (*British Isles Lupus Assessment Group*) e o SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity*). Os três últimos índices se mostraram reprodutíveis, válidos e com boa correlação entre si (FREIRE, et al., 2011; MACHADO, et al., 2014).

O índice SLEDAI tem sido utilizado para a avaliação da atividade de doença em vários centros de saúde do país. Esse índice foi desenvolvido e validado em 1985 em Toronto por reumatologistas experientes como um índice clínico para avaliar a progressão da doença, o qual se mostrou sensível e aplicável na clínica e na pesquisa (GLADMAN, et

al., 2002). Esse instrumento inclui, em sua avaliação, parâmetros clínicos e laboratoriais, levando-se em conta o órgão acometido. Avalia a atividade da doença com relação aos últimos 10 dias. Escores superiores a 4 indicam doença ativa. 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 (GLADMAN, et al., 2002).

O SLEDAI passou por uma revisão no ano de 2000, dando origem ao SLEDAI- 2K. A persistência do eritema malar, das úlceras mucosas, da alopecia e da proteinúria superior a 0,5 g em 24 horas pode ser usada em trabalhos para a avaliação da atividade da doença, ao comparar o SLEDAI-2K com o SLEDAI original. A diferença entre o SLEDAI e SLEDAI-2K é baseada na persistência dos parâmetros acima mencionados e não apenas na presença desses em casos recém diagnosticados ou em período de recorrência (FREIRE, et al., 2011).

Provas sorológicas podem ser utilizadas para a avaliação da atividade da doença, sendo as mais importantes a dosagem de anticorpos anti-dsDNA, níveis de complemento e de seus produtos e os níveis séricos de interleucinas, especialmente IL-6, IL-10 e IL-16. Não há um único marcador sorológico que se correlacione com a atividade da doença em todos os pacientes (ADINILFI, et al., 2016).

Os regimes de tratamento atuais incluem três grandes classes de medicamentos, os corticosteróides, os imunossupressores e os antimaláricos. Esses regimes estão frequentemente associados a efeitos adversos e podem levar a manifestações piores que a doença propriamente dita. Altas doses de corticosteróides podem resultar, a longo prazo, em cataratas, infecções, obesidade, osteoporose, hipertensão e diabetes. Dessa forma, identificar, e até mesmo prever, a atividade da doença é de extrema importância para um planejamento adequado do tratamento da doença (FREIRE, et al., 2011).

Atualmente, novas drogas vem sendo testadas e utilizadas na prática clínica, dentre elas destacam-se as que inibem por diversos mecanismos as funções de linfócitos B autoreativos. As células B produzem o fator estimulador de linfócitos B (BLys) que é expressado como uma proteína transmembrana em monócitos, macrófagos e células

dendríticas. A forma solúvel do BLys é biologicamente ativa e crítica para o crescimento e sobrevivência dos linfócitos B. Vários estudos mostram que aproximadamente 30% dos pacientes com LES possuem níveis elevados de BLYS e se correlacionam com níveis elevados de anticorpos IgG, especialmente anti-DNA dupla-fita e com a atividade da doença mensurada pelo SLEDAI. O Belimumab é um anticorpo monoclonal que inibe o BLys e foi o primeiro agente biológico e medicamento aprovado depois de 55 anos pelo FDA para o tratamento do LES. Estudos atuais demonstraram, que a utilização do Belimumab em lúpus juvenil, de forma independente de grupos raciais ou étnicos, pode trazer melhora significativa. (ADINOLFI, et al.,2016). Outro medicamento utilizado é o Rituximabe (RTX). O mesmo é um anticorpo monoclonal quimérico contra o CD20, um antígeno expresso nas células B, que foi utilizado, pela primeira vez, em 1997, para o tratamento dos linfomas não Hodgkin. Em 2006, teve aprovação concedida para o tratamento da artrite reumatoide, em combinação com metotrexato, para os pacientes não responsivos à terapêutica com agentes anti-TNF. Em estudo desenvolvido por Machado et al, 2014, foi demonstrado que Rituximabe pode trazer benefícios aos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, com tolerabilidade boa e efeitos colaterais brandos, apresentando resposta variável, de acordo com o sistema acometido. Os grupos com manifestações exclusivamente hematológicas e osteoarticulares apresentaram resposta completa ao uso do medicamento. No estudo desenvolvido por Vital et al, 2015, foi visto que a eficácia do Rituximabe é dependente do sistema acometido, pois pacientes com LES cutâneo não apresentaram resposta ao tratamento.

2.3- Autoimunidade e desenvolvimento do LES

O desenvolvimento da autoimunidade no LES tem sido atribuída à perda da tolerância ao próprio, devido à inadequada deleção de células auto-reativas, central ou periférica, levando à produção de autoanticorpos com especificidades múltiplas (MECKLENBRAUKER, et al., 2002). Esta autoimunidade, pode ser evidenciada pela presença de autoanticorpos anti-DNA e outros antígenos nucleares, bem como para fosfolípidos (WALPORT, et al., 1998). Já foi demonstrado que autoanticorpos estão presentes em pacientes com LES, alguns anos antes do desenvolvimento de sintomas clínicos (ARBUCKLE, et al., 2003).

Foi demonstrado que células T de pacientes com LES apresentam numerosas anomalias funcionais que contribuem para patogênese da doença e servem como potenciais biomarcadores. As células T possuem alta capacidade em aderir e migrar para o tecido inflamado e contribuir para o dano do órgão infiltrado em pacientes com LES. Relacionado aos linfócitos, sabe-se que o desequilíbrio no número de células T helper e a deficiência das células T reguladoras (Treg) podem estar envolvidos na patogênese do LES (CRISPIN, et al., 2009).

Os mecanismos utilizados na regulação da resposta imune em diferentes patologias ainda não estão elucidados, porém recentemente tem-se observado a participação de subpopulações de células T CD4⁺ no controle da resposta imune. Células T coexpressando CD4 e altos níveis da molécula CD25 foram descritas como sendo células caracterizadas como anérgicas em respostas a estímulos policlonais, com elevada capacidade de suprimir a produção de citocinas e a proliferação celular (BAECHER-ALLAN, et al., 2001). Essas células denominadas T reguladoras apresentam função protetora em várias situações infecciosas e patológicas. Existem duas populações de células T reguladoras: as induzidas (ou adaptativas) e as naturais (ou constitutivas). A população de células T reguladoras naturais expressa o marcador de superfície CD25 e o repressor de transcrição FOXP3. Essas células são naturalmente geradas no timo e constituem de 5 a 10% das células T CD4⁺ periféricas em animais e humanos (BAECHER-ALLAN, et al., 2002). O papel destas células mostra importância crucial na regulação de distúrbios auto-imunes, uma vez que está associada à manutenção da tolerância periférica (BAECHER-ALLAN, et al., 2002). De acordo com Bonelli, 2008 o número de células Treg mostrou uma correlação inversa com os níveis de anticorpos anti-DNA, mas não apresentou correlação com níveis de fatores do complemento em pacientes com LES.

A expressão do fator de transcrição FOXP3 é necessária para o envolvimento e atividade funcional de células Treg. Nos últimos anos, estudos envolvendo Treg foram realizados por vários grupos, porém os resultados sobre o desequilíbrio nas células Treg ainda são inconclusivos. A maioria dos estudos mostrou números reduzidos de células e função prejudicada nas células Treg no LES. Já outros grupos falharam em observar essas alterações, no entanto observou-se resistência da célula T efetora à ação regulatória das células Treg (ALUNNO, et al., 2012).

2.4- Sistema de complemento, biomarcadores e produtos de ativação do sistema complemento ligados a células do sangue

O sistema complemento corresponde a um conjunto de proteínas plasmáticas e de membrana que participam da imunidade inata contra microrganismos, além de auxiliar na imunidade humoral. Esse complexo sistema está envolvido na resposta imune e no processo inflamatório pela geração de fragmentos que promovem quimiotaxia das células inflamatórias, aumento da fagocitose por neutrófilos e macrófagos, participação na ativação de células B e T e remoção de imunocomplexos circulantes e de células apoptóticas (LISZEWSKI, et al., 2007). Estudo realizado demonstrou que o sistema complemento pode, também, exercer outras funções no organismo humano. Sabe-se que o mesmo participa de processos diversos como a maturação de sinapses, angiogênese, regeneração de tecidos, mobilização de células tronco hematopoéticas progenitoras e metabolismo lipídico (RIKLIN, et al.,2010).

As proteínas do sistema complemento são produzidas principalmente no fígado e são encontradas no plasma na sua forma latente. A ativação ocorre rapidamente após influência de um estímulo específico, seguindo uma cascata de auto-amplificação. Atualmente são reconhecidas três vias principais de ativação: a clássica, a alternativa e a da lectina (FIGURA 2).

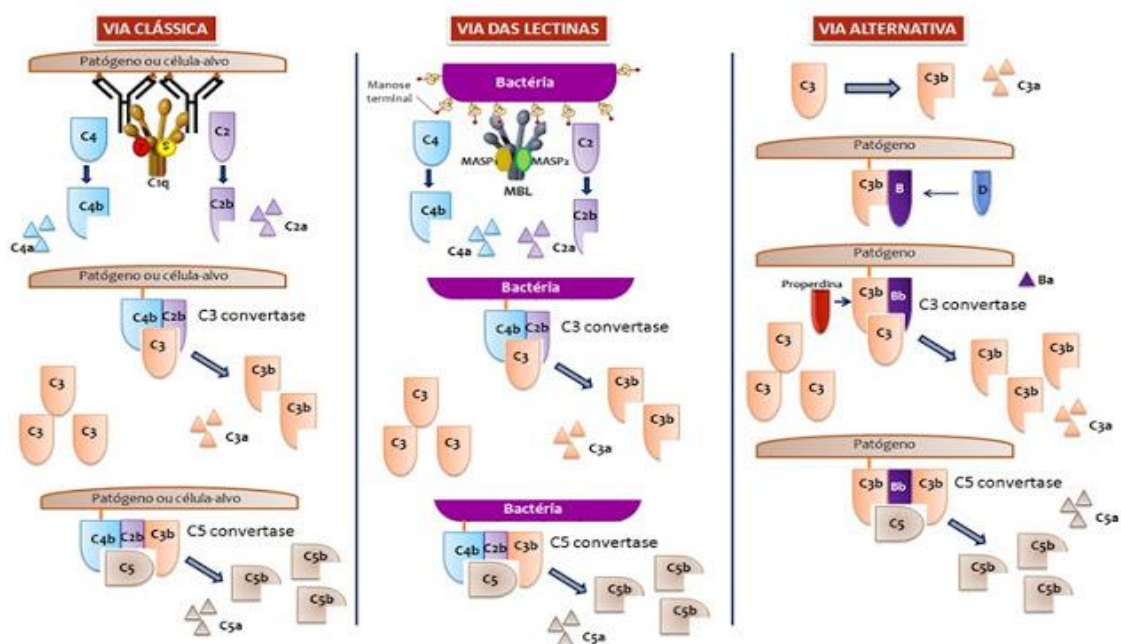


FIGURA 2: Diferentes vias de ativação do sistema complemento. Modificado de TRINDADE, 2007.

A via clássica é ativada quando anticorpos IgG ou IgM se ligam a antígenos (vírus, bactérias ou auto-antígenos) fazendo parte da resposta imune específica. A via alternativa corresponde a um sistema mais primitivo, que não requer a presença de anticorpos específicos, sendo ativada a partir da hidrólise espontânea do terceiro componente do complemento (C3) e sua deposição na superfície do microrganismo. A terceira via é composta pela lectina ligadora de manose, uma proteína da família das lectinas dependentes de cálcio. Essa via é ativada quando a lectina se liga ao terminal manose existente em diferentes grupos de bactérias. Embora o estímulo inicial de ativação e os componentes envolvidos sejam diferentes, todas as vias têm um objetivo central que é a ativação do C3. A ativação da via clássica do complemento, através de C1, C4 e C2, e a da via alternativa, através do C3 e dos fatores B e D, acarretam a clivagem e a ativação de C3. O fragmento de proteína C3b, parte do C3, é necessário para a ativação dos componentes terminais do sistema complemento (C5 a C9). Estes formam o complexo de ataque à membrana (MAC) que, quando inseridos dentro das membranas celulares, formam poros levando à lise osmótica da célula (TRINDADE, et

al., 2007). No entanto, a ativação do sistema complemento pode conduzir a respostas imunológicas não apenas fisiológicas, mas também patológicas com múltiplos danos imuno-inflamatórios em diferentes tecidos, como acontece no LES. Algumas das respostas inflamatórias associadas ao LES podem ser induzidas pela ativação patológica do sistema complemento (ADINOLFI, et al., 2016).

Uma das mais notáveis associações genéticas no LES é a alta frequência de deficiência dos componentes iniciais do complemento principalmente C1 (90-93%), C4 (75%) e C2 (10%). A deficiência homocigótica completa de C4 é rara, mas é fortemente relacionada ao LES. Mais de 75% dos pacientes com deficiência de C4 desenvolvem essa doença. Aproximadamente 50% dos pacientes com LES e deficiência de C4 apresentam glomerulonefrite (MACEDO, et al., 2016).

O biomarcador é definido pela característica de servir como indicador de processos biológicos normais, processos patológicos, intervenções terapêuticas e respostas farmacológicas, sendo que os mesmos podem ser avaliados e mensurados por diferentes métodos (ROBINSON, et al., 2016). Alguns biomarcadores já são utilizados rotineiramente para diagnosticar e tratar doenças reumáticas. Porém, há uma necessidade crescente de novos biomarcadores tanto na prática clínica, quanto para auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos. Como exemplo, biomarcadores que possam auxiliar o diagnóstico clínico precoce e permitir a intervenção terapêutica. Biomarcadores preditivos podem orientar decisivamente a tomada de decisão, reduzir custos de desenvolvimento de fármacos e identificar indivíduos susceptíveis a uma terapia específica. O advento de novas tecnologias como o sequenciamento de ácidos nucleicos, proteômica e citometria de fluxo dentre outras, permite a identificação de novos e promissores biomarcadores (ROBINSON, et al., 2016). No LES a presença de autoanticorpos que formam imunocomplexos são capazes de ativar componentes do sistema complemento através de sua via clássica e pode-se inferir que as proteínas do complemento sejam consumidas em uma extensão proporcional à atividade da doença. Assim, as quantificações das frações C3 e C4 do sistema de complemento têm sido historicamente utilizadas como testes de laboratório para avaliar atividade em pacientes com LES. Porém, apesar de pacientes com LES inativo apresentarem níveis de C3/ C4 e CH50 significativamente diminuídos, os mesmos apresentaram-se como fracos preditores de mudanças subsequentes na atividade do LES (ADINOLFI, et al., 2016). O

CH50 é um ensaio funcional que avalia a capacidade do soro testado em lisar hemácias de carneiro sensibilizadas com anticorpos de coelho, dependente do complemento. Todos os nove componentes da via clássica são necessários para um resultado normal, que varia de 150 a 250 unidades/ml, dependendo dos reagentes padrões utilizados pelos laboratórios (ADINOLFI, et al., 2016).

Nesse contexto a identificação de biomarcadores específicos que possam ser utilizados para diagnosticar precocemente a doença, dimensionar sua reativação e gravidade, bem como monitorar a resposta ao tratamento é de grande importância clínica no LES. Evidências mostram que anormalidades na ativação do complemento e *clearance* de complexos imunes por eritrócitos podem ser elementos fundamentais na patogênese do LES (LIU, et al., 2010). Dessa forma, a descoberta e validação de produtos de ativação do complemento ligados a células do sangue (CB-CAP= *Cell-bound complement activation products*) como potenciais biomarcadores do LES podem ser importantes ferramentas para o melhor entendimento da fisiopatologia e do controle clínico dessa doença (FIGURA 3).

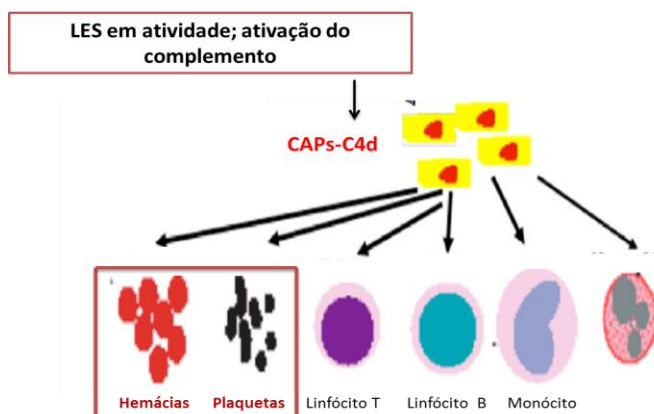


FIGURA 3: Fragmentos do sistema complemento ligados às células sanguíneas. Modificado de LIU, 2010.

Por meio de ensaios usando citometria de fluxo têm sido identificados diferentes CB-CAPs em células hematológicas circulantes com alta especificidade para o LES (MANZI, et al., 2004; LIU, et al., 2005; NAVRATIL, et al., 2006; LIU, et al., 2009).

A molécula de C4 é uma betaglobulina composta por três cadeias polipeptídicas denominadas alfa, beta e gama, com PM de 210 kD. A mesma contém ligações tioéster nas cadeias alfa capazes de interagir de forma covalente com proteínas de membrana de

células circulantes, sendo que várias células hematopoiéticas expressam esses receptores para fragmentos proteolíticos gerados durante a ativação do complemento (LEFLLER, et al., 2014).

De acordo com Liu, et al., 2011 considerando o grande número e a localização dos eritrócitos (sangue periférico e medula óssea), foi hipotetizado por estes autores que estas células circulantes do sangue com fácil acesso aos produtos derivados do sistema do complemento, poderiam servir como vetores biológicos da condição inflamatória *in vivo* e, portanto, da atividade da doença em pacientes com LES. Sabe-se que eritrócitos se desenvolvem a partir de células tronco hematopoiéticas na medula óssea e emergem como reticulócitos, com características fenotípicas distintas por 1 a 2 dias antes de completarem seu amadurecimento para eritrócitos. Tal fato permitiu aventar a hipótese que reticulócitos liberados na corrente circulatória durante um estado de doença ativa podem ter sido imediatamente expostos a fragmentos derivados de C4 gerados a partir da ativação do complemento, ocorrendo em seguida à ligação destes fragmentos aos precursores eritrocitários (R-C4d=Reticulócitos - C4d).

Dessa forma, tem sido hipotetizado que níveis de R-C4d podem efetivamente e precisamente refletir a atividade atual da doença em um dado paciente em um determinado momento. O curso natural do LES consiste de episódios intermitentes da doença, com recaídas e remissões que podem estar correlacionadas com a extensão das reações inflamatórias envolvendo complemento (LIU, et al, 2010). Ainda relacionado aos CB-CAPs e de acordo com estudo desenvolvido por Navratil, et al., 2006, pacientes positivos para P-C4d (C4d ligado à plaqueta) apresentaram uma maior frequência de eventos cardiovasculares associados com trombose do que pacientes negativos para P-C4d. Estudo longitudinal sugere que pacientes com LES com níveis anormais de P-C4d podem representar um subgrupo de pacientes com tendência trombótica aumentada e risco de complicações cardiovasculares e cerebrovasculares (NAVRATIL, et al.,2006). Dessa forma, baseado no exposto acima, pode-se admitir que estas novas ferramentas laboratoriais possam servir como uma nova classe de biomarcadores personalizados para diagnóstico e monitoração da atividade da doença, avaliação e predição das características clínicas e estratificação de subtipos de LES.

2.5- Hemostasia e alterações hemostáticas relacionadas ao LES

O conceito clássico da cascata da coagulação, conforme proposto em 1964, por Macfarlane, Davie & Ratnoff descreve as interações bioquímicas dos fatores da coagulação, entretanto, tem falhado como um modelo do processo hemostático *in vivo*. Tal proposta divide a coagulação em uma via extrínseca (dependente de fator tissular) e uma via intrínseca (dependente do contato do sangue com uma superfície contendo cargas elétricas negativas) que convergem para uma via comum, a partir da ativação do fator X (FX), resultando na geração de trombina e formação de fibrina. Conforme Hoffman, et al., 2003 e revisado por Ferreira, et al., 2010 e Vesteeq, et al., 2013, nos últimos anos surgiu um novo modelo da coagulação baseado em superfícies celulares, o qual propõe a ativação do processo de coagulação sobre diferentes superfícies celulares, em quatro fases que se sobrepõem: iniciação, amplificação, propagação e finalização, cujo produto final é a formação de fibrina. O novo modelo está ilustrado na FIGURA 4.

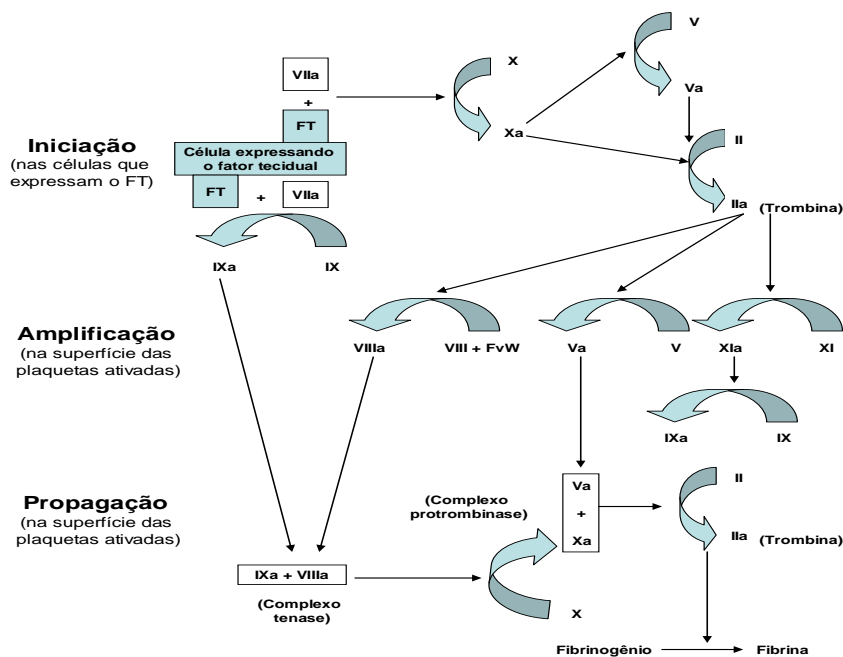


FIGURA 4: Novo modelo da coagulação baseado em superfícies celulares. Modificado de FERREIRA, 2010.

Uma vez formada a fibrina e esta tendo cumprido seu papel no processo hemostático normal, há necessidade de clivagem desta fibrina resultando em produtos solúveis de

degradação, entre os quais o principal é o dímero-D (DDi). O DDi é um indicador global de ativação da coagulação e da fibrinólise, sendo, portanto, um marcador indireto de atividade trombótica (BATES, 2012). O DDi é um marcador confiável e sensível de deposição e estabilização de fibrina. Segundo Tripodi, et al., 2011, sua determinação pode ser útil no diagnóstico e no manejo de várias condições clínicas relacionadas a eventos trombóticos, incluindo diagnóstico de tromboembolismo venoso (TEV), identificação de indivíduos em risco aumentado do primeiro evento trombótico (arterial ou venoso) ou recorrência de tais eventos, estabelecimento da duração ótima da profilaxia secundária após um primeiro episódio de TEV, monitoração de gravidez, e diagnóstico ou monitoração de coagulação intravascular disseminada (CIVD). Por outro lado, vários quadros não trombóticos cursam também com aumento de DDi, tornando esse parâmetro não específico para trombose. Em pacientes hospitalizados ou acometidos por essas condições, o teste de DDi é limitado, assim como em pacientes com hipofibrinólise, nos quais se espera resultados falso-negativos. Não obstante essa limitação, várias aplicações para a dosagem de DDi têm sido estabelecidas, sobretudo no diagnóstico (COSMI, et al, 2010., COSMI, et al, 2011., AGENO, et al, 2012., PALARETI, et al, 2015). Para que o processo de coagulação não se perpetue levando a uma coagulação disseminada, é essencial a sua inibição pelo mecanismo de anticoagulação natural contrapondo às forças procoagulantes. Conforme revisto por Versteeg, et al., 2013, os inibidores de proteases circulantes tais como antitrombina (AT), cofator II da heparina e inibidor da via do fator tissular (TFPI) eliminam fatores da coagulação ativados por ataque a seus sítios ativos. Por outro lado, outra modalidade de anticoagulação natural é desempenhada pela via das proteínas C e S que agem em conjunto levando à inativação proteolítica dos fatores FVIIIa e Va e, suprimem dessa forma, a ação dos complexos tenase e protrombinase. Adicionalmente, a proteína S (PS) pode se ligar ao TFPI para promover mais inibição da atividade do FXa. Conforme mencionado acima, no processo de coagulação há formação de trombina, uma enzima com importantes funções biológicas. Uma delas é transformar o fibrinogênio em fibrina enquanto uma outra função, quando sua concentração está maior, é se ligar à trombosmodulina (TM), uma proteína expressa sobre as células endoteliais. Uma vez ligada à TM, a trombina cliva proteoliticamente a PC (que está em complexo com EPCR- receptor endotelial de PC) tornando-a ativada (PCa) e, então competente para

exercer sua ação anticoagulante juntamente com a PS clivando os fatores VIIIa e Va (VERSTEEG, et al., 2013) e, então, reduzindo o potencial hipercoagulável. A TM, uma glicoproteína de membrana com papel vaso protetor, além de sua propriedade anticoagulante apresenta também efeitos antifibrinolítico e antiinflamatório. Cumpre ressaltar ainda que a TM é liberada do endotélio para o plasma, evento frequentemente indicativo de dano celular de caráter inflamatório (VERSTEEG, et al., 2013). A Figura 5 apresenta o mecanismo da anticoagulação natural e seus principais componentes.

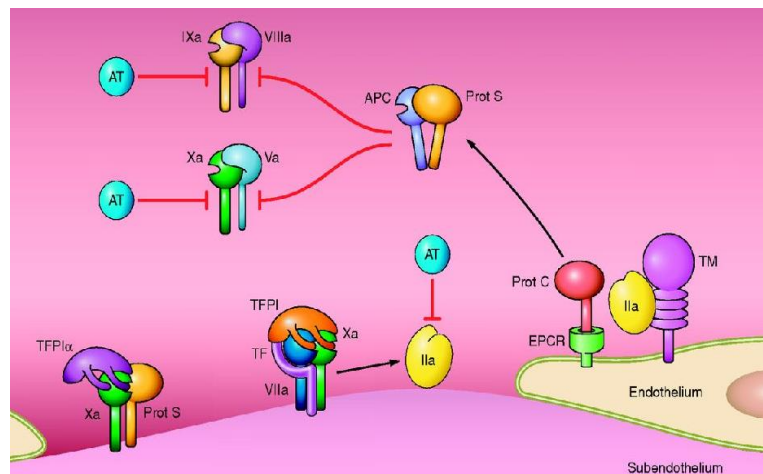


FIGURA 5: Mecanismo da anticoagulação natural mediado pelas proteínas C e S culminando com a proteólise de FVIIIa e FVa, dependente do endotélio Modificado de VERSTEEG 2013.

O C4BP constitui um potente inibidor da via clássica do sistema do complemento, sendo que este é um sistema em cascata que faz parte da defesa imune inata, sendo potencialmente prejudicial também para as células hospedeiras e requerendo rigor em sua regulação (WEBB, et al., 2002). A proteína C4BP é formada por sete cadeias tipo alfa idênticas e uma única cadeia tipo beta ligadas por pontes dissulfeto (BLOM, et al., 2002). As cadeias alfa ligam-se ao alvo C4b, enquanto a cadeia beta liga-se à PS, a qual apresenta alta afinidade para fosfolípidos carregados negativamente, sendo que a exposição da fosfatidilserina (cargas negativas) é um evento precoce na superfície de células apoptóticas (WEBB, et al., 2002). Segundo o mesmo autor, a proteína S localiza C4BP na superfície das células apoptóticas através da ligação à fosfatidilserina exposta,

sendo o C4BP ligado à célula apoptótica capaz de ligar C4b. Dessa forma, alterações no mecanismo apoptótico podem desencadear processo inflamatório, resultando em níveis elevados de C4d.

A maior parte da PS no plasma circula em complexo com a proteína ligadora de C4b (C4BP – *C4b-binding protein*), com ação anticoagulante reduzida, ao contrário da PS livre que exerce maior efeito anticoagulante não apenas como cofator da PCa (proteína C ativada), mas também por outros mecanismos. Estes incluem competição com a protrombina pela ligação direta ao FVa, inibição do FXa ou promoção da interação FXa-TFPI (HACKENG, et al, 2006).

Conforme revisado por Rezende, et al., 2003, 40% da PS em plasma humano circula na forma livre e 60% em complexo com a C4BP, o que sugere que a concentração de C4BP é importante na modulação da atividade anticoagulante da PCa. Como nos processos inflamatórios a concentração de C4BP está elevada, pode-se admitir que nas doenças inflamatórias os níveis de PS livre tendem a estar baixos favorecendo um estado de hipercoagulabilidade. Ainda de acordo com Rezende, et al., 2003, acredita-se que o complexo PS-C4BP possa agir como um elo de ligação entre os sistemas da coagulação e inflamatório devido ao envolvimento de C4BP na regulação da ativação do complemento. C4BP tem sido reportado como um fator ineficaz na degradação de C4b quando este está presente na superfície celular, sugerindo que C4BP possa ter um importante papel antes de C4b ser depositado nesta superfície. Isso poderia ser importante para evitar deposição de complexos inflamatórios em tecidos e para a tolerância para antígenos “*self*” (próprios) portanto, fornecendo proteção contra inflamação e autoimunidade (BARILLA-LABARCA, et al., 2002).

Pacientes com LES apresentam um risco significativamente aumentado para distúrbios arteriais e trombose venosa, o que representa uma importante causa de morbidade e mortalidade nesta doença. A incidência de infarte do miocárdio, entre os pacientes com LES, é 50 vezes maior se comparado com pessoas que não apresentam a doença (PEREIRA, et al., 2006; HEPBURN, et al., 2010). O dano vascular no LES pode ocorrer por uma diversidade de mecanismos dentre eles a vasculite e estados de hipercoagulabilidade, como é o caso da síndrome do anticorpo antifosfolípide (SAF).

Além dos tradicionais fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento da aterosclerose na população geral, a inflamação tem sido implicada como fator importante neste mecanismo, em particular, aquela associada com a lesão do endotélio vascular. As células endoteliais e os leucócitos infiltrados nas placas ateroscleróticas produzem uma variedade de mediadores inflamatórios. O processo inflamatório provavelmente contribui para a aterogênese no LES, uma doença caracterizada por inflamação crônica. Deste modo, a patogênese da doença cardiovascular no LES é multifatorial, decorrente da interação entre os fatores de risco tradicionais e lesão vascular mediada por inflamação, SAF dentre outros (HACKENG, et al, 2006).

Vários mecanismos podem ser responsáveis pelo estado hipercoagulável no LES, dentre eles falhas nos processos de anticoagulação natural. Conforme mencionado anteriormente, o mecanismo da anticoagulação natural é mediado pela ação integrada das proteínas C ativada (PCa), da proteína S (PS) e do inibidor da via do fator tissular (TFPI), além da antitrombina (AT). A ação da PCa é maximizada tendo como co-fator essencial a PS. Dessa forma, as duas proteínas agem em conjunto proteolizando os fatores Va e VIIIa, limitando então a formação de trombina, enzima responsável pela transformação do fibrinogênio em fibrina (O'BRIEN, et al., 2000). Já a AT inibe a formação de fibrina por complexar a trombina já formada, limitando sua ação sobre o fibrinogênio, prevenindo então a formação de fibrina. A PS é uma proteína dependente da vitamina K sendo sintetizada no fígado e no endotélio vascular, e está presente no plasma na concentração de 350nM. A PS consiste na mais importante proteína do mecanismo da anticoagulação natural, uma vez que estimula a atividade tanto da proteína C ativada (PCa) como do inibidor da via do fator tissular (TFPI) (HACKENG, et al., 2006., NDONWI & BROZE, 2008). Dessa forma, a deficiência de PS consiste em um importante fator de risco para o desenvolvimento de trombose venosa (PERARAMELLI, et al., 2012).

Nos processos inflamatórios é sabido que os níveis de PS livre (forma funcional) tendem a estar reduzidos. Alguns mecanismos já foram propostos para essa redução e sabe-se que, anticorpos antifosfolípidos podem também causar uma deficiência funcional de PS por ligação à PS livre. Pacientes com LES apresentam frequentemente, esses anticorpos os quais tem sido associados com eventos trombóticos (ALARCO N-

SEGOVIA, et al., 1989). Por outro lado, é sabido que a deficiência adquirida de PS em decorrência de LES pode ocorrer devido à presença de anticorpos anti-PS. Entretanto, nem a prevalência de anticorpos anti-PS e nem o seu significado clínico em associação com os níveis de PS no LES são conhecidos (RUIZ-ARGUELLES, et al., 1991). Como fenômenos trombóticos são frequentes em pacientes com LES e a hipercoagulabilidade se relaciona diretamente com inflamação e dano ao endotélio vascular, a mensuração de TM solúvel como marcador de vasculite e DDi como indicador de hipercoagulabilidade e fibrinólise torna-se interessante. Os ensaios de DDi já possuem um papel estabelecido no diagnóstico de distúrbios clínicos de tromboembolismo venoso e coagulação intravascular disseminada. No entanto, há literatura crescente sugerindo que o DDi pode também ser um biomarcador importante nas doenças ateroscleróticas (ARMAGHAN, et al., 2015). Já a TM é uma glicoproteína com uma ampla distribuição em células e tecidos, a mesma possui um vasto papel fisiológico. Quando expressa na superfície luminal de células endoteliais vasculares em grandes vasos e capilares possui a função primordial de resistência endotelial a fenômenos trombóticos. A ligação da trombina (IIa) ao receptor endotelial da TM modifica as propriedades da trombina, aumentando a especificidade desta a proteína C, que, juntamente com seu cofator (PS), inativa os fatores VIIIa e Va conforme já mencionado anteriormente, suprimindo a gênese de trombina. Portanto, a TM é uma molécula chave para a manutenção da propriedade anticoagulante do endotélio vascular. Em doenças que cursam com lesão endotelial observa-se a elevação de TM em sua forma solúvel (FIONA, et al., 2013).

Neste contexto, o presente estudo avaliou a hipótese de que no LES, os níveis de CB-CAPs podem ser preditores de atividade da doença (R-C4d) e de predisposição trombótica (P-C4d). O potencial trombótico foi também avaliado por meio da determinação de importantes componentes da anticoagulação natural, tais como proteína S e proteína ligadora de C4b (C4BP), bem como dos níveis de TM para avaliação de dano endotelial, e DDi para avaliação do estado hipercoagulável, buscando-se uma possível associação entre estes parâmetros e outros investigados rotineiramente. Caso confirmada essa hipótese, os resultados poderão contribuir para elucidação do mecanismo pelo qual os pacientes com LES se tornam mais predispostos a eventos trombóticos.

3.0-JUSTIFICATIVA

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das formas graves do LES e sua morbidade são ainda pouco compreendidos. A análise de particularidades na patologia das diferentes formas clínicas sugere que fatores múltiplos possam estar envolvidos no seu estabelecimento. Devido a esses fatores, a busca por parâmetros hematológicos, hemostáticos e imunológicos que podem caracterizar diferenças entre pacientes com as diferentes manifestações do LES faz-se ainda necessária para compreensão da dinâmica desse processo.

Estudos prévios tem sugerido que os produtos de ativação do complemento ligados às células hematológicas, constituem potenciais biomarcadores prognósticos para monitorar pacientes com LES (LIU, et.al., 2005; NAVRATIL, et al., 2006). Entretanto, um perfil completo destes produtos de ativação do complemento ligados a diferentes tipos celulares poderá fornecer importantes subsídios sobre mecanismos celulares e moleculares específicos. Em especial, tem sido sugerido que a avaliação de produtos de ativação do Complemento ligado à reticulócitos (R-C4d) pode revelar atividade da doença, importante parâmetro norteador da conduta médica.

Um aspecto importante a considerar consiste no fato que no LES, fenômenos inflamatórios estão intimamente associados. Então, admite-se conseqüentemente um estado pró-trombótico, uma vez que mecanismos inflamatórios contribuem para o aumento dos fatores procoagulantes, diminuição dos anticoagulantes naturais e inibição da atividade fibrinolítica (ESMON, 2003). Dentro desse contexto, observa-se a importância da relação entre aspectos inflamatórios relacionados a atividade do LES e fatores hemostáticos, com base no fato de que fenômenos trombóticos são eventos importantes que aumentam a morbidade e mortalidade associada à doença (CHEN & DORLING, 2009).

Com base no exposto acima, o presente estudo se propõe a responder algumas importantes questões, tais como:

-Níveis elevados de R-C4d (Reticulócitos-C4d) refletem atividade da doença e correlacionam com os índice SLEDAI-2K? Existe alguma correlação entre os resultados de R-C4d e algum parâmetro laboratorial convencional?

-Níveis elevados de P-C4d (Plaquetas-C4d) refletem atividade da doença e correlacionam com os índice SLEDAI-2K? e TM?

- Há correlação entre o potencial hipercoagulável e os resultados do índice SLEDAI-2K?

Deve-se ainda ressaltar que o diagnóstico do LES continua sendo um desafio para médicos reumatologistas, mesmo para aqueles experientes. A heterogeneidade de manifestações clínicas pode dificultar o diagnóstico correto contribuindo para agravar o processo. O não entendimento dos complexos mecanismos envolvidos na doença, dificultam também a predição de recaídas desta e o desenvolvimento de drogas com maior eficácia terapêutica. Em nosso país, a abordagem dada à doença e seu monitoramento se baseia em resultados e conclusões estabelecidos por meio de estudos realizados no exterior. Os estudos em nosso meio são limitados e muitas lacunas ainda permanecem. Portanto, estudos focados em pacientes do nosso meio podem trazer importantes informações acerca das características clínicas e laboratoriais dos mesmos, o que poderá repercutir em benefícios aos pacientes. Por outro lado, espera-se que as técnicas não rotineiras implantadas para o presente estudo, bem como o conhecimento gerado pelo uso destas possa ser ampliado mediante o desenvolvimento de outros projetos correlatos com foco nesta complexa doença.

Ressalta-se que o desenvolvimento do presente estudo se justificou pela potencialidade do uso destes biomarcadores na prática clínica, contribuindo para o diagnóstico precoce das crises de atividade da doença, já que condutas médicas adequadas refletirão em menos danos ao paciente com doença ativa. Como a citometria de fluxo, na atualidade, constitui uma técnica bastante disseminada em nosso meio, a implantação de tais biomarcadores na prática laboratorial, em adição aos já existentes, é algo bastante factível e com grande potencial para contribuir consideravelmente no manejo de pacientes com quadro grave de LES sob tratamento.

4.0 – OBJETIVOS

4.1-Objetivo Geral:

Identificar biomarcadores potenciais de risco de atividade moderada/alta recente e com tendência trombótica no LES e correlacionar os níveis desses marcadores com o índice SLEDAI-2K.

4.2-Objetivos específicos:

- Determinar os níveis plasmáticos dos produtos de ativação do complemento ligados aos reticulócitos (R-C4d) como potenciais marcadores para o risco de atividade moderada/alta recente da doença;

- Avaliar os níveis plasmáticos dos produtos de ativação do complemento ligados às plaquetas (P-C4d) como potenciais marcadores para o risco de atividade moderada a alta da doença, bem como correlacionar com marcadores de predisposição trombótica (Proteína S, Proteína ligadora de C4b, trombomodulina e Dímero-D);

- Avaliar o potencial hipercoagulável por meio da determinação dos níveis plasmáticos de PS, proteína ligadora de C4b (C4bBP), DDi e TM;

- Comparar os níveis de todos os biomarcadores dos pacientes com LES com os resultados dos níveis observados no grupo controle;

- Correlacionar os níveis de todos os biomarcadores dos pacientes com LES com a atividade da doença definida pelo índice SLEDAI-2K.

5.0-Delineamento experimental

5.1-Characterização da população de estudo:

5.1.1-Pacientes:

As pacientes com LES, segundo critérios de classificação da ACR 1997, foram recrutadas sequencialmente no ambulatório de Reumatologia da Santa de Misericórdia de Minas Gerais, no período de fevereiro de 2013 a abril de 2016. As pacientes foram atendidas pela equipe médica que obteve os dados clínicos e laboratoriais utilizados no estudo. Para a composição do grupo com LES foram excluídas pacientes portadoras de outras patologias associadas, doenças imunossupressoras inclusive HIV/AIDS ou outras infecções, uso de anticoagulantes orais ou outros medicamentos com comprovada ação sobre o mecanismo hemostático; autoimunidade (excluindo LES) e pacientes que não autorizaram e/ou não assinaram o termo de consentimento da pesquisa. Foram excluídas também de qualquer grupo, mulheres grávidas. Quanto ao grupo controle foram selecionadas mulheres sem doenças autoimunes, infecciosas e/ou inflamatórias e sem histórico familiar de LES. Foi realizada avaliação laboratorial das participantes do grupo controle, tendo sido a inclusão destas por meio de testes bioquímicos (glicemia, enzimas hepáticas, proteinúria, hemograma e urina rotina) auto relato da condição clínica e da exclusão de medicamentos com potencialidade de afetar o sistema imune ou hemostático.

Para o presente estudo foram selecionadas 90 mulheres no total, sendo este observacional, analítico e transversal. Foi feita a opção por uma amostra de conveniência, com inclusão de todos os pacientes que atendessem aos critérios de inclusão e exclusão e que quisessem participar do estudo, identificados durante o período de tempo estabelecido para a seleção dos participantes que foi de fevereiro de 2013 a abril de 2016. De acordo com estudo desenvolvido por Yee, et al., 2011 e com base nos critérios de SLEDAI -2K, 30 pacientes com LES foram classificadas com a doença em baixa atividade (SLEDAI-2K \leq 4) e 30 com a doença em moderada/alta atividade (SLEDAI-2K $>$ 4).

5.1.2-Controles:

Foram selecionadas 30 mulheres sem LES (controles), pareadas por idade e da mesma fonte ou nível sócio econômico compatível com o das pacientes. A idade das participantes variou de 18 a 69 anos. O presente estudo foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP e apresenta o número de protocolo 01928412.8.0000.5149.

5.2- Obtenção de amostras de sangue:

Foi coletada uma amostra de 15 mL de sangue de cada participante elegível para o estudo, cujo volume foi distribuído conforme mostra a Figura 6.

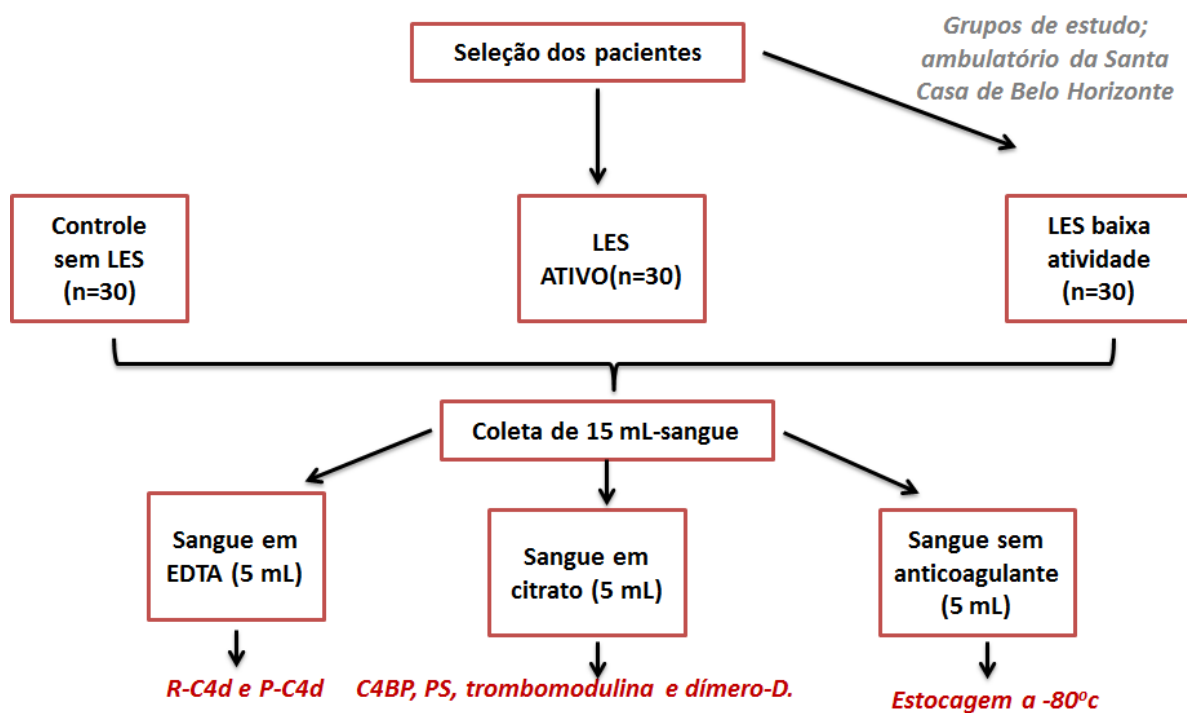


FIGURA 6: Representação esquemática da estratégia de trabalho com referência às amostras de sangue, bem como o número de pacientes e controles envolvidos em cada etapa experimental.

Durante consulta médica, as pacientes foram informadas sobre a pesquisa, com posterior assinatura do TCLE, caso concordassem em participar da mesma. Uma ficha clínica com informações relevantes para o desenvolvimento da pesquisa, incluindo dados clínicos e epidemiológicos e outros considerados de importância, foi preenchida para cada paciente pela equipe médica responsável. Os outros resultados laboratoriais foram obtidos a partir do prontuário médico de cada paciente.

5.3- Determinação de CB-C4d (Cell bound- C4d) por citometria de fluxo (R-C4d e P-C4d):

A determinação dos níveis sanguíneos de R-C4d foi realizada de acordo com Liu, et al., 2005. Amostras de sangue total (5 mL) coletadas foram lavadas 3 vezes e posteriormente diluídas com salina fisiológica (utilizamos 5 µL de sangue total e adicionamos 1 mL de salina fisiológica para lavagem). Após a lavagem, utilizamos 5 µL de sangue e 1 mL de salina fisiológica para efetuarmos a marcação com os anticorpos. Utilizamos um anticorpo monoclonal murino específico para C4d (reativo com fragmentos contendo C4d; Quidel, San Diego, CA) ou para o controle isotópico MOPC-21, que foi adicionado a suspensões de hemácias (5 µL) a uma concentração de 10 µg/ml (50µL de anticorpo diluído 1:100). Anticorpo de cabra anti IgG F(ab')² murino conjugado com ficoeritrina foi empregado a uma concentração de 10 µg/ml (2,5 µL). Após a coloração com anticorpo, as suspensões celulares foram incubadas com *Thiazole orange* (ReticCount reagent; Becton Dickinson) para identificar reticulócitos ou com salina (controle não marcado). As células coradas foram analisadas por citometria de fluxo (FORTESSA- BD, E.U.A).

A determinação dos níveis sanguíneos de P-C4d foram realizadas segundo NAVRATIL et al., 2006 e LU, et al, 2012. Amostras de sangue total coletadas em EDTA (5 mL) foram centrifugadas para separação do plasma rico em plaquetas (PRP). Foram utilizados 150 µL do PRP para marcação com anticorpos monoclonais. Primeiramente foi utilizado o anticorpo anti-CD42a (2,5 µL) conjugado com isotiocianato de fluoresceína para identificação da população de plaquetas (BD Biosciences, San Jose, CA). De forma semelhante ao descrito para o R-C4d foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-C4d (Quidel, San Diego, CA), ou o controle isotópico, MOPC21 na

concentração de 10 µg/mL. Por fim foi adicionado o anticorpo secundário anti IgG F(ab')² conjugado com ficoeritrina na concentração de 10 µg/ml (50µL de anticorpo diluído 1:100). As células coradas foram analisadas por citometria de fluxo (FORTESSA- BD, E.U.A). Aquisição e análise dos dados no citômetro de fluxo será citada de forma apropriada nos artigos mostrados na seção resultados.

5.4- Determinação dos níveis plasmáticos da trombomodulina (TM) e dímero-D (DDi):

A determinação quantitativa de TM em amostras de plasma citratado foi realizada com o conjunto diagnóstico IMUNOBIND[®] Trombomodulina ELISA (American Diagnostica Inc. - Stanford, CT), seguindo as instruções do fabricante contidas na bula do kit.

O teste de ELISA IMUBIND ELISA " sandwiche " foi realizado para a determinação da TM, tendo sido utilizado anticorpo monoclonal que reconhece os domínios EGF1 - EGF2 da TM. As amostras foram incubadas em micropoços pré-revestidos com o anticorpo de captura. Um segundo reagente (HRP) conjugado com anticorpo monoclonal específico para os domínios EGF5 - EGF6 foi utilizado, pois este reconhece a trombomodulina ligada. A adição do substrato perborato de tetrametilbenzidina (TMB) e sua subsequente reação com o HRP resultou em solução de cor azul. A sensibilidade foi aumentada pela adição de uma solução de paragem de ácido sulfúrico, transformando a cor da solução de azul para amarela. Níveis de TM foram determinados medindo a absorvância a 450 nm da solução e comparando os valores com os da curva padrão.

A determinação quantitativa de DDi em amostras de plasma citratado foi realizada com o conjunto diagnóstico IMUNOCLONE[®] D-DIMER ELISA (American Diagnostica Inc. - Stanford, CT), seguindo as instruções do fabricante contidas na bula do kit. Este método utiliza um anticorpo monoclonal contra DDi humano acoplado à superfície dos poços da placa de teste. Durante o período de incubação o DDi da amostra em análise liga-se à superfície do poço coberta com anticorpos. Depois de uma etapa em que proteínas estranhas à reação são retiradas por lavagem, é adicionado um anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase (HRP), que reconhece o DDi ligado e completa a formação do complexo sanduíche anticorpo. Após outra etapa de lavagem, é

adicionado um substrato aos poços da placa e a reação com HRP forma uma solução de cor azul. A reação enzima-substrato é interrompida pela adição de ácido sulfúrico, que muda a cor da solução para amarelo. O nível de DDi é quantificado pela medida da absorbância da solução em 450nm e comparação dos valores com os da curva padrão. Esta curva foi construída a partir de diluições do plasma calibrador com concentração conhecida, seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante.

5.5- Determinação dos níveis plasmáticos de C4BP e PS:

A PS total foi determinada pelo método de ELISA através do KIT diagnóstico Asserachrom® PS:Ag (Diagnostica Stago®, Asnière, France). O procedimento consiste em incubar o plasma do paciente com anticorpos anti-PS marcados com peroxidase. Esta enzima é responsável por romper o substrato TMB com posterior quantificação em espectrofotômetro na absorbância de 450 nm. Os resultados foram expressos em% com valor de referência entre 70% a 130%.

Os níveis plasmáticos de C4BP foram medidos por método imunológico de turbidimetria utilizando látex (LIATEST C4BP; Diagnostica Stago). Para a confecção dos calibradores utilizou-se pool de 15 plasmas oriundo de mulheres híginas. Após a confecção do procedimento descrito na bula a absorbância das amostras foi medida em 540 nm.

Os protocolos para os referidos testes se encontram anexos no presente trabalho.

5.6- Análises estatísticas:

Com relação às análises estatísticas foi utilizado o software GraphPad Prism 6TM. Todas as análises realizadas são citadas, de forma apropriada na seção Resultados, nos artigos apresentados a seguir. $P < 0.05$ foi considerado significativo em todas as análises estatísticas.

6.0- Resultados

Os resultados obtidos no presente estudo serão apresentados a seguir na forma de artigos perfazendo um total de 4 (quatro).

6.1- Artigo 1: FERREIRA KS, LOURES CDMG, CAMPOS FMF ET AL. LEVELS OF CIRCULATING RETICULOCYTES-C4D: IS THERE LINK TO DISEASE ACTIVITY IN PATIENTS WITH SLE? INT J HEALTH SCI RES. 2017; 7(1):130-137.

Levels of Circulating Reticulocytes-C4d: Is There Link to Disease Activity in Patients with SLE?

Karine Silvestre Ferreira¹, Cristina de Mello Gomide Loures¹, Fernanda Magalhães Freire Campos¹, Walter Batista Cicarini¹, Luan Carlos Vieira¹, Vicente de Paulo Coelho Peixoto Toledo¹, Cláudia Lopes Santoro Neiva², Renato Vargas Consoli², Paulo Madureira de Pádua², Maria das Graças Carvalho¹

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

²Serviço de Reumatologia, Santa Casa/BH, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding Author: Karine Silvestre Ferreira

Received: 21/11/2016

Revised: 09/12/2016

Accepted: 19/12/2016

ABSTRACT

Objective: The determination of cell-bound complement activation products (CB-CAPs), such as C4d linked to reticulocyte (R-C4d), are potential biomarkers of disease activation state. Within this context, this cross-sectional study aimed to assess whether, in SLE, R-C4d levels can be predictors of the disease activity in a set of patients selected from Brazilian population.

Method: Forty patients with SLE confirmed by the American College of Rheumatology (ACR) classification criteria who were assessed at the time of the visit to the clinic using the SLEDAI-2K index (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000) were recruited, besides to 20 adult healthy subjects (controls). Patients with SLEDAI ≤ 4 were classified as having low disease activity (SLE-I, n = 20) and those with SLEDAI > 4 as carriers of active disease (SLE-A, n = 20). Peripheral blood samples were collected in EDTA with subsequent separation of reticulocytes population and analyze by flow cytometry to determine the levels of R-C4d.

Results: A positive correlation between R-C4d levels and SLEDAI 2K was observed. Significant differences between controls and LES-A ($p < 0.0001$), and between LES-I and LES-A ($p < 0.0001$) were observed.

Conclusion: Since reticulocytes are present in the peripheral blood for a period of only 24-48 hours and then turning into mature erythrocytes, higher levels of R-C4d may reflect early active disease. Thus, increased R-C4d expression may be a useful tool for screening disease severity at initial diagnosis and for monitoring disease status of patients.

Keywords: Cell bound complement c4d, reticulocytes, systemic lupus erythematosus of disease activation state.

INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disorder affecting multiple organs whose etiology is not well understood. ⁽¹⁾ Features of the disease include production of autoantibodies, excessive complement system activation and immune complexes deposition in various tissues. ^(2,3) Among the various manifestations of SLE, lupus nephritis (LN)

is the most relevant occurring in up to 50% of the patients at the diagnosis, and up to 60% of patients during the course of the disease. ⁽⁴⁾

In current clinical practice, diagnosis of SLE is complicated by the diversity of clinical signs and absence of a specific laboratory test. Currently, diagnosis and classification of SLE is made using the criteria proposed by American College of

Rheumatology (ACR) and a clinical index can be used to evaluate disease activity as SLEDAI-2K (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000) that records clinical manifestations and laboratory data of affected patients. ⁽⁵⁾

Given the complexity of LES, many studies have been conducted to better understand its pathophysiology and such studies enabled the development of some biomarkers to be used in clinical practice. Complement system activation is observed in patients with SLE inducing pathological immune responses. Within this context, the discovery and validation of complement activation products associated with blood cells (CB-CAP = Cell-bound complement activation products) can be an important tool for clinical management of SLE as potential biomarkers. ⁽⁶⁻⁸⁾ Using flow cytometry methodology different CB-CAPs have been identified in circulating blood cells with high specificity to SLE. ⁽⁶⁻¹⁰⁾ Due to number and location of erythrocytes it was hypothesized that these circulating cells could serve as biological vectors in vivo of inflammatory condition and therefore markers of disease activity in patients with SLE. Another fact is that red cells develop from hematopoietic stem cells in the bone marrow and emerge as reticulocytes, with different phenotypic characteristics for 1 to 2 days before reaching their maturation to erythrocytes. Reticulocytes released into the bloodstream during a state of active disease may have been immediately exposed to C4-derived fragments generated from the complement activation occurring after the connection of these fragments to erythrocyte precursors. Thus, it has been hypothesized that reticulocyte-C4d (R-C4d) levels can be considered a predictive biomarker reflecting early disease activity. ^(6,7) Based on the above described, this study intends to reexamine this hypothesis by investigating whether high levels of R-C4d reflects disease activity, as well as whether its levels correlates with the SLEDAI-2K index, in patients with or without active disease, under treatment. Our main motivation for

the developing the present study was the frequent severity of the disease, diagnostic difficulties due to its multiple presentations, together with the lack of accurate and reliable laboratory method.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Forty patients with SLE diagnosed according to ACR classification criteria (1997) were sequentially recruited in the Rheumatology Clinic of Santa Casa Hospital, Minas Gerais, Brazil, from February 2013 to April 2016. Patients were assisted by medical staff through which clinical and laboratory data were obtained. Patients with SLE-related diseases, immunosuppressive diseases including HIV / AIDS, autoimmunity, patients who did not authorize and / or did not sign the consent and pregnant women were excluded. All patients were under treatment, alone or in combination. Drugs such as azathioprine, prednisone and hydroxychloroquine were the most used by patients. As control group, twenty women were selected with no autoimmune and/or inflammatory diseases and no family history of SLE. Laboratory evaluation of the control group participants was held using conventional biochemical tests as glucose, liver enzymes, blood count, urine routine and proteinuria, and all results were normal. Clinical status and exclusion of drugs with the potential to affect immune system was checked by self reporting.

For this study women were selected with age ranging from 18 to 69 years old. According to Yee et al, 2011 ⁽¹¹⁾ and based on SLEDAI -2K criteria, 20 patients were classified with inactive disease or low activity disease (SLEDAI-2K \leq 4) and 20 with active disease (SLEDAI-2K $>$ 4) while simultaneously were selected 20 age matched women without SLE or other diseases (controls). According to renal biopsy results, patients were also classified as having lupus nephritis (n=14) or not (n=21) at the moment of their enrollment in this study. This study was reviewed and approved by Research Ethics Committee of

the Federal University of Minas Gerais, Brazil (protocol number CAAE - 01928412.8.0000.5149), and informed consent was obtained from all participants. The research protocol did not interfere with any medical recommendations.

A sample of 5 ml EDTA.K3 of peripheral blood from each fasting eligible participant was collected. Samples were analyzed for R-C4d immediately after venepuncture.

Flow cytometry technique optimization for R-C4d complement fragments

Determination of R-C4d blood levels was performed according to Liu et al., 2005. Briefly, whole blood samples were washed, diluted with physiological saline and aliquoted for staining using a murine monoclonal antibody specific for C4d (reactive with fragments containing C4d; Quidel, San Diego, CA) or isotope control MOPC-21, which was added to red blood cells (RBC) suspensions at concentration of 10 µg/mL (50 µL - 1: 100 dilution). Goat anti IgG F (ab')² conjugated to a secondary murine antibody labeled to phycoerythrin was used at a concentration of 10 µg/ml (2,5 µL). After antibody staining, cell suspensions were incubated with thiazole orange (ReticCount reagent; Becton Dickinson) to identify reticulocytes or with saline (unlabeled control). Stained cells were analyzed using flow cytometry (BD FORTESSA, U.S.A.).

Data acquisition and analysis in flow cytometer

Flow cytometer used in this study is equipped with argon lamp that allows a basic evaluation of at least 10 parameters. Identification of the target cell population and determination of percentage of this population and subpopulation were made using BD FACSDiva SoftwareTM (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) coupled to a cytometer. Analysis of the cell population was performed using Flow Jo (FlowJo Enterprise). For analysis of R-C4d levels, erythrocytes were identified based on their "forward and side-scatter" (Size x Granularity) properties (FIGURE

1Ai and Bi), while reticulocytes were identified based on their forward-scatter properties and positive staining with thiazole orange (size x color) (FIGURE 1Aii and Bii). From previous chart, histograms were performed to analyze expression intensity of C4d on reticulocytes surface (FIGURE 1Aiii and Biii). Values were calculated as specific R-C4d expression less specific isotope control expression.

Statistical analysis

Data analysis was performed using GraphPad Prism software 6TM, using t - Student test and analysis of variance (ANOVA), in case of normal distribution data for comparisons among two and three groups, respectively. In case of non- normally distributed data, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used. Kolmogorov-Smirnov test was performed to evaluate normality of variables. In all cases, significance was considered at p< 0.05. There were also carried out correlation tests between of R-C4d expression and SLEDAI 2K index using Spearman.

RESULTS

Characteristics of the study participants

Table 1: Clinical characteristics of the patients with SLE

Characteristics	Results (%)
Age, mean +/- sd (range) years	43 +/- 12.18 (18-69)
Clinical manifestations, % positive since SLE diagnosis	
Antinuclear antibodies (fan)	71,5
Arthritis	36,4
Photosensitivity	34,0
Hematologic manifestations	42,0
leukopenia	7,9
Thrombocytopenia	11,4
Anemia	10,23
Proteinuria	38,6
Low complement C4	36
Low complement C3	29
Malar rash	28,4
Anti-dna/anti-sm	20,5

The study population consisted of 40 women with SLE and 20 healthy controls. At the time of entry into the study, mean ± SD age of the patients with SLE was 43 ± 12.18 years (range 18-69 years), while mean±SD age of the healthy control subjects was 44.7±12.9 years. The study included patients with new-onset as well as longstanding disease, showing a broad range

of disease activity, as reflected in the SLEDAI-2K score, and had a wide spectrum of organ involvement. Additional

demographic and clinical features of the patients with SLE are shown in Table 1.

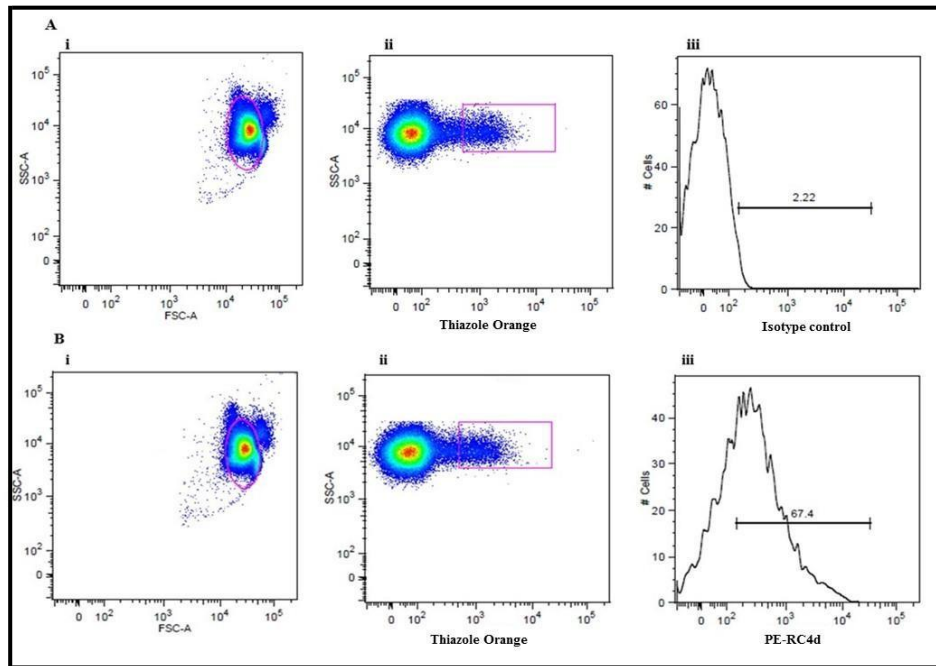


Figure 1: Analysis for R-C4d by flow cytometry. Isotype control R-C4d (Ai, ii and iii). Marking for R-C4d (Bi, ii and iii). Figures Ai and Bi show erythrocytes. Figures Aii and Bii show the population of reticulocytes by Thiazole Orange. Figures Aiii and Biii show the median fluorescence intensity histogram to assess the R-C4d on reticulocytes expression.

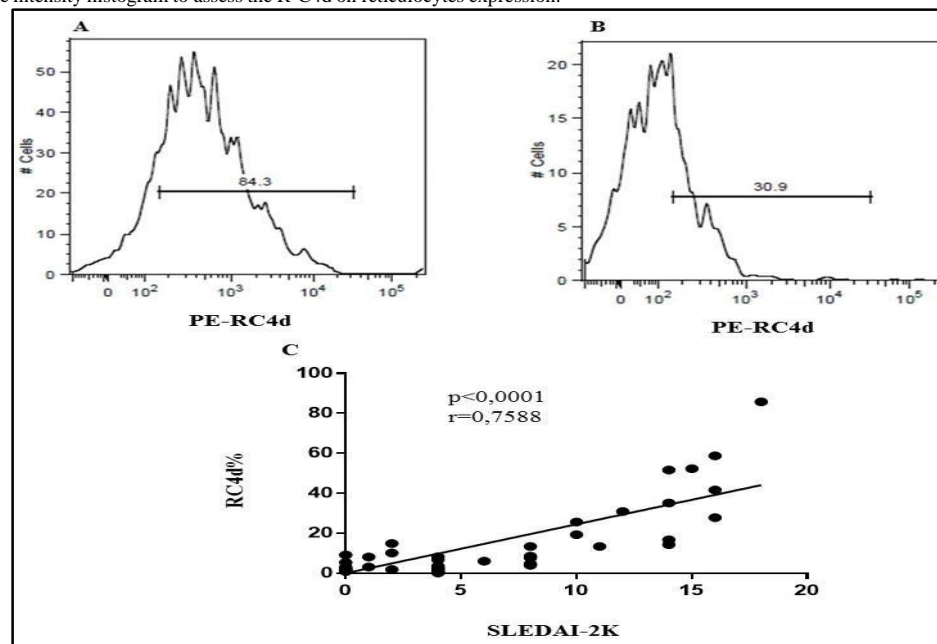


Figure 2: RC4d expression and correlation with SLEDAI-2K. Median fluorescence intensity (SMFI) histograms for R-C4d in patients with SLE and SLEDAI 2K=18 (A), SLEDAI-2K= 12 (B) obtained by flow cytometry as described in the methodology. Spearman correlation of R-C4d expression by flow cytometry and SLEDAI 2K values (C). P values <0.05 were considered statistically significant.

R-C4d expression and correlation with SLEDAI-2K index

For R-C4d technical validation, initially two blood samples obtained from two patients were tested with proven high

activity disease confirmed by high values for the SLEDAI index. A positive correlation between levels of this biomarker and SLEDAI-2K was found for the two patients with SLE, aged eighteen and thirty years old, diagnosed by the Rheumatology team from Santa Casa Hospital, Belo Horizonte, Brazil, according to criteria described in methodology. Clinical activity of SLE was determined and the eighteen years old patient had SLEDAI = 18, while

the 30 years patient had SLEDAI = 12. Samples were analysed by flow cytometry and R-C4d levels were correlated to clinical activity of SLE. The newly diagnosed patient with the disease in its more severe form (SLEDAI=18) showed high expression of R-C4d (84.3% reticulocytes) (FIGURE 2A), while the patient with less serious activity (SLEDAI=12) had a lower expression of R-C4d (30.9% of reticulocytes) (FIGURE 2 B).

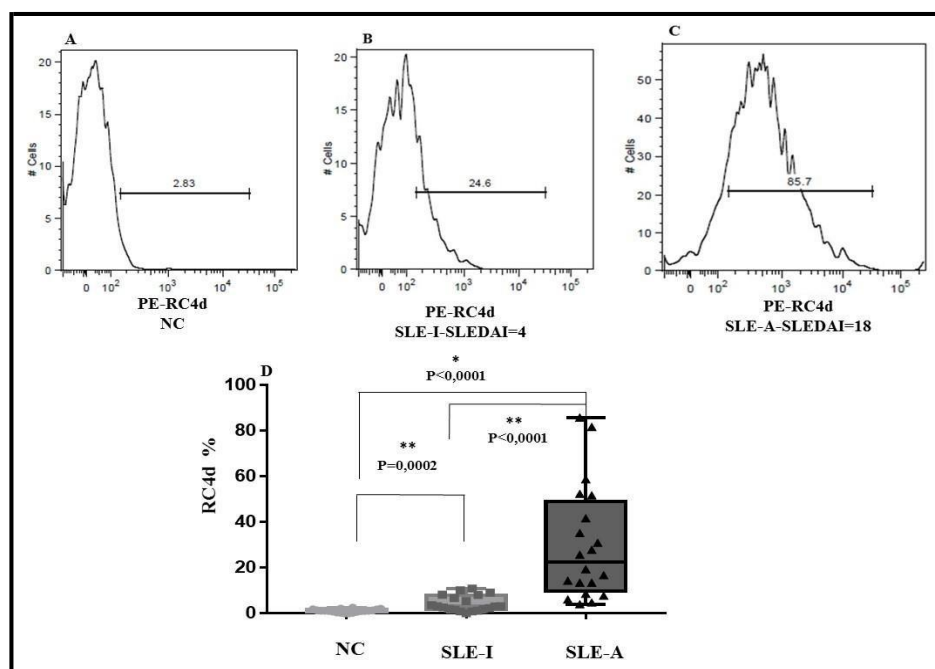


Figure 3: R-C4d expression in individuals with no disease (controls), in patients with inactive or active SLE. Median fluorescence intensity histograms for R-C4d in controls (A), SLE-I (B), and SLE-A (C). Expression of RC4d (in percentage) in controls and in patients with inactive (SLE-I) or active disease (D). Statistical tests: Kruskal-Wallis (*) and Mann-Whitney (**).

R-C4d expression in SLE patients with active, inactive/low activity disease and healthy controls

In a second phase of the study, Thirty-five patients with active and inactive/low active disease, under treatment, were analysed by flow cytometry. After assessment of reticulocytes populations using FlowJo software, R-C4d analysis was performed using technique and antibody concentrations described in standard methodology. Interestingly it was observed highly significant differences in R-C4d percentages among SLE-A (active SLE, SLEDAI-2K > 4), SLE-I (inactive SLE, SLEDAI-2K ≤ 4) and healthy control

groups ($p < 0.0001$, Kruskal-Wallis test) (FIGURE 3A, B, C and D). It was observed that R-C4d expression is decreased in both SLE-I and control groups (FIGURE 3, B and D). After applying Mann-Whitney test significant differences between controls and SLE-A ($p < 0.0001$), and between SLE-A and SLE-I groups ($p < 0.0001$) were observed. The highest R-C4d values were observed in SLE-A group (FIGURE 3 C and D). R-C4d expression in women without SLE and in patients with both inactive and active SLE was also evaluated. Significant differences were observed and the highest expression values for R-C4d were observed in SLE patients ($p < 0.0001$ Mann-Whitney

test) (FIGURE 4). The same analysis was applied to patients with and without lupus nephritis (LN) compared to the control group. R-C4d expression was higher in patients with LN ($p < 0.0002$) (FIGURE 5).

In a second phase of the study, correlation analyses were conducted between R-C4d expression and SLEDAI-2K index in all patients. A positive correlation among of R-C4d expression and higher SLEDAI 2K-index was observed and followed the severity of disease (FIGURE 2 C).

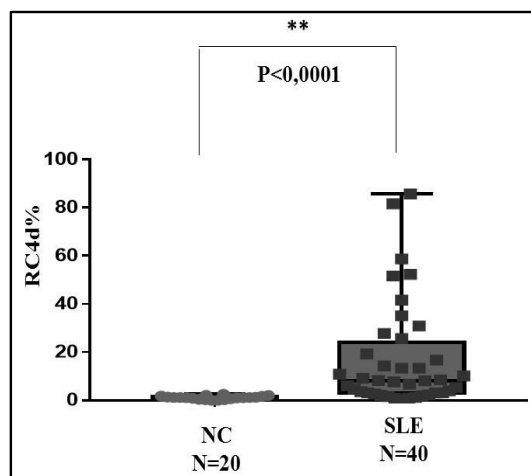


Figure 4: Expression of RC4d (in percentage) in controls and in patients SLE. Statistical tests: Mann-Whitney (**).

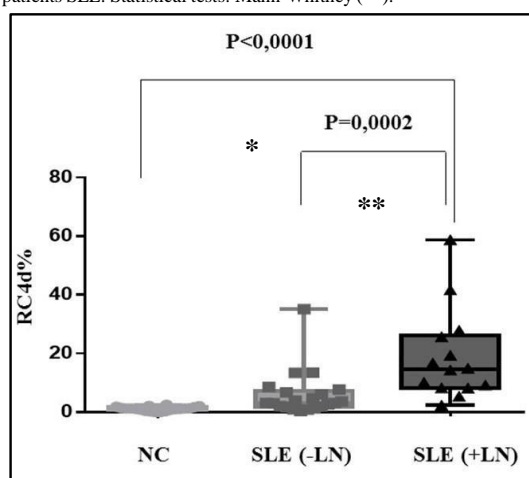


Figure 5: Expression of RC4d (in percentage) in controls and in patients without SLE nephritis (-LN) and SLE nephritis (+LN). Statistical tests used: Kruskal-Wallis (*) and Mann-Whitney (**).

DISCUSSION

Quantification of C3 and C4 fractions of the complement system have

been historically viewed as "gold standard" laboratory tests for SLE. Decrease of C3 and C4 in patients with SLE is correlated to increased inflammation and disease activity, however there is a wide range of variation of C3 and C4 in serum among healthy individuals, and this variation is superimposed in SLE patients. Acute phase response during inflammation can lead to an increased synthesis of both C3 and C4. By other side, partial C4 deficiencies are commonly present in the general population. (6-8)

Inactive complement proteins are present in circulation and tissues, and may interact with cells (erythrocytes and lymphocytes) or tissues (endothelial cells). C4 complement system activation products containing thioester bonds can interact covalently with membrane proteins of circulating cells and various hemopoietic cells expressing receptors to proteolytic fragments generated during complement activation. (6-8) Therefore, components of complement system related to cells may be potential biomarkers for SLE, much more reliable than soluble complement proteins.

In this context, considering the rapid exposure of reticulocytes to proteolytic fragments of complement system and its transience in circulation, determination of R-C4d expression may reflect the status of disease at any given time in patients, and may be a very promising tool for monitoring the adopted therapy and signaling of relapses (flares). It is also worth noting that the use of this biomarker to assess severity of disease during diagnosis may better guide physicians in prescribing the most appropriate therapeutic measures when starting treatment.

Results of present study are in line with previous findings and reinforces the potential of this biomarker for use in rheumatology clinic, which still requires a comprehensive method validation and its application in other parts of the world. In short, our results together with those observed in literature give potential value to this biomarker as a screening method for

evaluating the severity of each newly diagnosed patient and to signal treatment failure. This assertion is based on the fact that R-C4d levels were correlated with SLE clinical activity according to the index used to evaluate disease, SLEDAI-2K. In other words, it was observed that higher the SLEDAI score, greater clinical severity, correlated to higher R-C4d expression (FIGURE 2 A, B and C), reflecting a very recent state of active disease. Therefore, R-C4d levels are effectively related to recent SLE activity, according our data.

When comparing SLE-A and SLE-I patients, R-C4d expression levels were significantly higher in population with active SLE. Regard to SLE-I and controls, it was observed very low R-C4d expression for both groups (FIGURE 3A, B, C and D), which indicates that these SLE patients may be under good control.

According to results obtained in this study and in accordance with other studies already published, it can be assumed that complement activation products related to blood cells are potential biomarkers to monitor disease activity in patients with SLE. However, a complete profile of these complement activation products linked to different cell types can provide important information on a specific cellular and molecular mechanism. In particular, from data obtained in this study, the evaluation of complement activation products on reticulocytes (R-C4d) may suggest a strong association between increased expression of R-C4d and recent disease activity in patients under treatment which may indicate treatment failure. In addition greater expression of this R-C4d in patients with lupus nephritis could possibly contribute to renal injury.

It should also emphasize that SLE remains a challenge even for experienced rheumatologists doctors. The heterogeneity of clinical manifestations and the complex and not fully understood mechanisms involved in the disease become difficult to predict activity. In Brazil, approach and monitoring of SLE disease is based mostly

on studies and findings conducted in other countries. Studies in our population are still limited and many gaps remain. The mechanisms involved in LES deterioration process and morbidity are still poorly understood. Studies of new biomarkers that predict activity may provide a more immediate and targeted approach to patients with this complex disease, and thus pharmacotherapeutic approaches may be imposed in order to prevent the development and aggravation of SLE.

CONCLUSION

R-C4d was able to identify early disease activity (flares), reinforcing previous findings.

A positive correlation between higher levels of C4d and scores obtained by the SLEDAI-2K, whose increased values indicate disease activity may reflects inflammation *in vivo*.

ACKNOWLEDGMENTS

To the Rheumatology Service of Santa Casa from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, for their valuable collaboration in patient recruitment. To patients for participating in this study and CNPq, CAPES and FAPEMIG for funding it.

REFERENCES

1. Cui Y, Sheng Y, Zhang X. Genetic susceptibility to SLE: recent progress from GWAS. *J Autoimmun.* 2013; 41:25-33.
2. Telles RW, Lanna CC, Ferreira GA, Souza AJ, Navarro TP, Ribeiro AL. Carotid atherosclerotic alterations in systemic lupus erythematosus patients treated at a Brazilian university setting. *Lupus.* 2008;17:105-13
3. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of auto antibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2003;349:1526-33
4. Iwata Y, Furuichi K, Kaneko S, Wada T. The role of cytokine in the lupus nephritis. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:594809. 49

5. Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol.* 2002; 29:288-91.
6. Liu CC, Manzi S, Kao AH, Navratil JS, Ahearn JM. Cell-bound complement biomarkers for systemic lupus erythematosus: from benchtop to bedside. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010; 36:161-72, x.
7. Liu CC, Kao AH, Hawkins DM, Manzi S, Sattar A, Wilson N, et al. Lymphocyte-bound complement activation products as biomarkers for diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Clin Transl Sci.* 2009; 2:300-8.
8. Liu CC, Manzi S, Kao AH, Navratil JS, Ruffing MJ, Ahearn JM. Reticulocytes bearing C4d as biomarkers of disease activity for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005; 52:3087-99

6.2- Artigo 2: CELL-BOUND COMPLEMENT ACTIVATION PRODUCTS AS AN USEFUL BIOMARKER FOR SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS ACTIVITY.

CELL-BOUND COMPLEMENT ACTIVATION PRODUCTS AS AN USEFUL BIOMARKER FOR SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS ACTIVITY

Karine Silvestre Ferreira¹, Cristina de Mello Gomide Loures¹, Fernanda Magalhães Freire Campos¹, Walter Batista Cicarini¹, Vicente de Paulo Coelho Peixoto Toledo¹, Edna Afonso Reis², Cláudia Lopes Santoro Neiva³, Renato Vargas Consoli³, Maria das Graças Carvalho¹.

1 Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

2 Department of Statistics, ICEX, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

3 Rheumatology Unit, Santa Casa Hospital, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding author:

Karine Silvestre Ferreira

Avenida Antônio Carlos, 6627 Federal University of Minas Gerais State

Faculty of Pharmacy Office 4102 Block 3

Campus Pampulha - Belo Horizonte/ Minas Gerais, Brazil 31270-901

Phone: +55 (31) 3409-6881 FAX: +55 (31) 31 3409-6985

email: ka.silvestre@gmail.com

RESEARCH ARTICLE

KEYWORDS: CELL BOUND COMPLEMENT C4d, RETYCULOCYTES, PLATELETS, SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS ACTIVATION.

ABBREVIATIONS

CB-CAP, Cell-bound complement activation products, SLE, Systemic Lupus Erythematosus, ACR, American College of Rheumatology, SLEDAI-2K index, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000, P-C4D, platelets exposed to fragments derived from C4, R-C4D, reticulocytes exposed to fragments derived from C4, SLE-A, active SLE SLEDAI-2K > 4, SLE-I, inactive SLE SLEDAI 2K ≤ 4, NC, normal controls.

ABSTRACT

Background

It is widely recognized that the identification of new biomarkers for detection and measure of activation early of the Systemic Lupus Erythematosus, is of great importance in clinical practice. Evidence has show that abnormalities in activation of the complement can be important elements in the pathogenesis of SLE. In this context, the validation of complement activation products linked to blood cells (CB-CAP = Cell-bound complement activation products) as potential biomarkers of SLE activity can be important tools for better understanding of the pathophysiology and clinical management of this disease.

Methods

The activity of the disease was defined by the clinical index (SLEDAI-2K). This study included women with similar age distributed in three groups: Group 1: healthy women (control, n = 20); Group 2: women with low activity of the disease (SLEDAI 2K ≤ 4, n = 20); Group 3: women with an active disease (high or moderate activity) (SLEDAI 2K > 4, n = 20). A sample of 5 ml EDTA.K3 of peripheral blood from each fasting eligible participant was collected. Samples were analyzed for R-C4d and P-C4d immediately after venepuncture.

Results

Levels of both biomarkers were significantly higher in patients with active disease (LES-A) compared to the levels of those with inactive disease (LES-I) and controls.

Conclusions

Analysis of the data set allows us to infer that such biomarkers can be potentially useful in the discrimination of patients with active disease and also in other specific situations involving patients with SLE.

1.0 INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune and multisystem disease whose etiology is not yet fully understood ^[1] with a highly variable prognosis, relapses (flares) and remissions related to individual variations, difficult therapeutic management and other unknown factors ^[2]. The features of the disease include production of autoantibodies, excessive activation of the complement system and deposition of immune complexes in various tissues which may also be damaged by local factors ^[3].

The diagnosis of SLE is difficult mainly because the diversity of clinical manifestations and no specific laboratory test. For the diagnosis of SLE is used a number of clinical criteria proposed by the American College of Rheumatology (ACR). For monitoring and characterization of patients with active disease can be used SLEDAI-2K index (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000) that considers clinical manifestations and results of laboratory tests of affected patients ^[4].

Currently, it is widely recognized that the identification of new specific biomarkers for early diagnosis of the disease, detection of activity and severity, as well as monitor the response to treatment is of great importance in clinical practice ^[5]. Evidence has shown that abnormalities in activation of the complement and clearance of immune complexes by erythrocytes can be important elements in the pathogenesis of SLE. In this context, the validation of complement activation products linked to blood cells (CB-CAP = Cell-bound complement activation products) as potential biomarkers of SLE activity can be important tools for better understanding of the pathophysiology and clinical management of this disease ^[6,7,8]. Through flow cytometry methodology high specificity and different CB-CAPs for SLE have been identified in circulating blood cells ^[6,7,8,9,10].

Among these various CB-CAPS, reticulocytes are exposed to C4-derived fragments generated from the complement activation (R-C4d). Since reticulocytes remain in circulation for 1 to 2 days before transforming into fully mature erythrocytes, and being released into the circulation during active disease, they could be immediately exposed to C4-derived fragments generated from the complement activation. Thus, it has been reported that R-C4d levels may reflect early or immediately disease activity [6,7,8]. Also related to the CB-CAPs and according to study by Navratil (2006), platelets may also be exposed to fragments derived from C4 (P-C4D). According to these authors, patients positive for P-C4D (C4D on the platelet) showed disease activity related to a higher frequency of cardiovascular events associated with thrombosis than patients negative for P-C4D. In view of the biological role of platelets in hemostasis and coagulation, one can admit that high levels of P-C4d can be biomarkers related to thrombotic tendency in patients with SLE. In this context, considering the CB-CAPs as a new class of biomarkers for diagnosis and monitoring of disease activity, and that the prevention of flares is essential to avoid worsening of the disease, substantial efforts must be made to achieve this purpose. Therefore, the present study aims to investigate whether high levels of R-C4d and E-C4d reflect SLE activity and correlate with SLEDAI-2K index searching to contribute to a better understanding of the role of CB-CAPs in the diagnosis of disease activity.

2.0 MATERIALS AND METHODS

2.1 Patients

Forty patients with SLE diagnosed according to ACR criteria (1997) were recruited sequentially in the Rheumatology Clinic of Santa Casa Hospital, Minas Gerais, Brazil, from February 2013 to April 2016. Patients were assisted by medical staff and clinical and laboratory data were obtained during their visit. Patients with SLE-related diseases, immunosuppressive diseases including HIV / AIDS, autoimmunity, and those who did not authorize and / or did not sign the consent, and pregnant women were excluded. All patients were under treatment with only one or a combination of drugs. Azathioprine, prednisone and hydroxychloroquine were the most common drugs used by patients. For

the control group, twenty women were selected with no autoimmune and / or inflammatory diseases and no family history of SLE. Laboratory evaluation of the control group was held using conventional biochemical tests such as glucose, liver enzymes, in addition to blood count, urine routine and proteinuria. All results were normal. Clinical status and exclusion of drugs with the potential to affect immune system were checked by self reporting. No symptom was reported by the participants.

For this study SLE women were selected with age ranging from 18 to 69 years old. According to Yee et al., 2011 and based on SLEDAI -2K criteria, 30 patients were classified with inactive disease or low activity disease ($SLEDAI-2K \leq 4$) and 30 with active disease ($SLEDAI-2K > 4$) while simultaneously were selected 20 age matched women without SLE or other diseases (controls). This study was reviewed and approved by Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais, Brazil (protocol number CAAE -01928412.8.0000.5149), and informed consent was obtained from all participants. The research protocol did not interfere with any medical recommendations.

A sample of 5 ml EDTA.K3 of peripheral blood from each fasting eligible participant was collected. Samples were analyzed for R-C4d and P-C4d immediately after venepuncture.

2.2 Flow cytometry optimization for R-C4d and P-C4d complement fragments

Determination of R-C4d blood levels was performed according to Liu et al., 2005. Briefly, whole blood samples were washed, diluted with physiological saline and aliquoted for staining using murine monoclonal antibody specific for C4d (reactive with fragments containing C4d; Quidel, San Diego, CA) or isotype control MOPC-21, which was added to red blood cells (RBC)suspension at the concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (50 μL - 1: 100 dilution). Goat anti IgG F (ab ') 2 conjugated to a secondary antibody to murine labeled to phycoerythrin was used at the concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2.5 μL). After antibody staining, cell suspensions were incubated with thiazole orange (ReticCount reagent; Becton Dickinson) to identify reticulocytes or with saline (unlabeled control).

Determination of P-C4d blood levels was performed according to Navratil et al., 2006 and Lu et al, 2012. Whole blood samples collected in EDTA were diluted in PBS and prepared for analysis in the flow cytometer. Firstly it was used anti-CD42a antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate to identify platelet population (BD Biosciences, San Jose, CA). In a similar manner to that described for R-C4d was used anti-C4d monoclonal antibody (Quidel, San Diego, CA) or the isotype control MOPC21 at the concentration of 10 µg /ml. Finally was added anti IgG secondary antibody F (ab ') 2 conjugated to phycoerythrin at a concentration of 10 µg/ml. Stained cells were analyzed using flow cytometry (BD Fortessa, U.S.A.).

2.3 Data acquisition and analysis in flow cytometer

Flow cytometer used in this study was equipped with argon lamp that allows evaluation of at least 10 parameters. Identification of the target cell populations and determination of their percentage were made using BD FACSDiva Software™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) coupled to a cytometer. Analysis of the cell population was performed using Flow Jo (FlowJo Enterprise). For analysis of R-C4d levels, erythrocytes were identified based on their "forward and side-scatter" (Size x Granularity) properties (FIGURE 1Ai), while reticulocytes were identified based on their forward-scatter properties and positive staining with thiazole orange (size x color) (FIGURE 1Aii). From previous chart, histograms were performed to analyze expression intensity of C4d on reticulocytes surface (FIGURE 1Aiii). Values were calculated as specific R-C4d expression less specific isotype control expression.

To evaluate the levels of P-C4d, platelets were identified by their "forward and side scatter" properties (FIGURE 1Bi) and CD42a expression as a specific platelet marker (FIGURE 1Bii). C4d-specific fluorescence bound to the platelets was determined by subtracting the mean fluorescence intensity (MFI) of isotype control MOPC21 from the MFI of platelets stained with anti-C4d (FIGURE 1Biii).

2.4 Statistical Analysis

Data analysis was performed using GraphPad Prism software 6™. Kolmogorov-Smirnov test was performed to evaluate normality of variables. In case of non-normally

distributed data, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used. In all cases, significance was considered at $p < 0.05$. Additionally it was used Minitab version 17 for performing histograms of R-C4d and P-C4d. The software was also used for the preparation of scatterplot showing definition of the limits of frequency for both markers. There were also carried out correlation tests between R-C4d and P-C4d expressions versus SLEDAI 2K index using Spearman test.

3.0 RESULTS

3.1 Characteristics of the study participants.

The study population consisted of 40 women with SLE and 20 healthy controls. At the time of entry into the study mean age of the patients with SLE was 42.5 and 33.5 for those with low activity disease and moderate / high disease activity, respectively) while the mean age was 34.5 years for healthy controls.

The study included new-onset patients with as well as longstanding disease, showing a broad range of disease activity, as reflected in the SLEDAI-2K score, and had a wide spectrum of organ involvement. Additional demographic and clinical features of the SLE patients are shown in Table 1.

3.2 R-C4d and P-C4d expression, and correlation with SLEDAI-2K index

Correlations between expression of both R-C4d and P-C4d versus values of SLEDAI-2K clinical index were performed. For validation of these tests blood samples from two patients with SLE, aged eighteen and thirty years old, classified according to the criteria described in the methodology section. So, by applying SLEDAI-2K, disease activity was determined for both patients (18 years old patient, SLEDAI-2K = 18; and 30 years old, SLEDAI-2K = 12). Samples were prepared for analysis in the flow cytometer as described before. It was found that expression of both R-C4d and P-C4d was significantly correlated with SLEDAI-2K index. In other words, the patient with a severe disease activity (SLEDAI-2K = 18) showed a higher expression of R-C4d (84.3% of reticulocytes) (FIGURE-2 2A), while the patient with a milder disease activity (SLEDAI-2K = 12) had a lower expression of R-C4d (30.9% of reticulocytes) (Figure 2 B). Very similar results were found for P-C4d; i.e., a higher C4d expression

bound to platelets was observed according to disease severity. Therefore, the patient classified as having SLEDAI-2K = 18 showed a higher expression of P-C4d (96.1% of platelets) (Figure 2D), while the patient with SLEDAI-2K=12, showed a lower expression of P-C4d (87.9% of platelets) (Figure 2 E).

Once that C4d expression bound to the cells followed the increase in SLEDAI- 2K index in both patients, correlation analysis was performed between R-C4d versus SLEDAI-2K, and between P-C4d versus SLEDAI 2-K index for all patients included in this study. As expected, it was observed a positive correlation between higher expression of both R-C4d and P-C4d, and higher SLEDAI-2K index (Figure 2C and 2F). In other words, the higher expression of both R-C4d and P-C4d the higher is also disease severity.

3.3 R-C4d and P-C4d expressions in SLE patients with active, inactive / low activity disease and in healthy controls

By means of flow cytometry technique evaluation of C4d expression bound to the cells was performed as described in methodology. Significant difference was observed in RC4d expression when compared the groups SLE-A (active SLE, SLEDAI-2K > 4), SLE-I (inactive SLE, SLEDAI 2K ≤ 4) and NC (normal controls) ($p < 0,0001$; Kruskal-Wallis) (Figure 3A, B, C). SLE-I and NC groups showed a lower expression of R-C4d (Figure 3, B). After applying Mann-Whitney test was verified difference between NC and SLE-A ($p < 0.0001$), and between SLE-A and SLE-I ($p < 0.0001$). Patients with SLE-A showed higher expression for R-C4d (Figure 3 C and D). It was also observed significant differences when compared SLE-I, SLE-A and NC groups ($p < 0.0001$, Kruskal-Wallis test) (Figure 3 E, F, G and H) . Increased expression of P-C4d was also observed in the group of SLE-A. Significant differences between NC and SLE-A ($p < 0.0001$), and between SLE-A and SLE-I groups ($p < 0.0001$ for both) (Figure 3 G and H) were observed.

3.4 Comparison between R-C4d, P-C4d and serum C4, with SLEDAI-2K

Correlation analyzes were performed between serum C4, R-C4d and P-C4D, with SLEDAI-2K index. There was a strong positive correlation between R-C4d and P-C4d

values in relation to the SLEDAI 2K-index ($r = 0.759$ and 0.822 , respectively; $p < 0.0001$). However, as expected, correlation between serum C4 (according to data from patients' records) and SLEDAI-2K index was negative ($r = -0.421$; $p = 0.009$) (Table 2).

3.5 R-C4d and P-C4D expressions, determination of a cut off point for defining activity of SLE

Since the increased expression of both R-C4d and P-C4d showed strong correlation with activity of SLE determined by SLEDAI-2K index, it was sought association between them to establish a probable cut off point to stratifying the disease concerning to its activity.

It was observed that values of R-C4d below 20% (Figure 4) and P-C4d below 40% (Figure 4 B) may together constitute a parameter indicative of low activity / inactivity of the disease. It was also observed that 95% of patients with SLE-I have lower values than 20% for R-C4d and 40% for P-C4d expressions (FIGURE 4C). Moreover, it was observed that 94.7% of patients with SLE-A had R-C4d and P-C4d above 20% and 40%, respectively (Figure 4C), indicating disease activity.

4.0 DISCUSSION AND CONCLUSION

In the present study levels of R-C4d and P-C4d were highly significantly correlated with clinical activity of SLE. Furthermore, it was observed that the higher SLEDAI-2K index (used to assess SLE activity), the higher was also C4d expression in both blood cells. In other words, a significantly higher expression of R-C4d (FIGURE 2 A, B and C) and P-C4d (Figure 2 D, E and F) was observed in the SLE-A patients. Due to the transience of reticulocytes in the peripheral blood (1-2 days only) high levels of R-C4d may be associated to an immediate state of active disease. Thus, this biomarker would indeed be able to indicate recent SLE activity.

Activation of the complement system in SLE patients may result in immune responses not only physiological but also pathological with multiple immuno-inflammatory damage in different tissues. Some of the inflammatory responses associated with SLE can be induced by pathological activation of the complement system. Since that autoantibodies and immune complexes activate complement system through its classical

pathway, it can be expected that complement proteins are consumed in a proportional extension of the activity of the disease. In this context quantification of serum C4 fraction of the complement system (among others, C3 and CH50) has historically been viewed as an important laboratory test to identify patients with active disease. Decrease of serum C4 in patients with SLE indicates increased inflammation and disease activity. However, measurement of this biomarker in serum may suffer some interference, thereby reducing its accuracy. A wide range of variation of serum C4 levels among healthy individuals exists and this variation is superimposed in patients with SLE. Another disadvantage is that laboratory tests measure serum C4 which is a soluble molecule sensible to hydrolysis processes [6,7,8]. Thus, components of the complement system related to cells may be potential biomarkers and much more reliable than soluble complement proteins. C4 activation products contain thioester bonds that can interact covalently with circulating cells membrane proteins, and various blood cells express such receptors to proteolytic fragments generated during complement activation. Based on these concepts, the study of this biomarker (C4) connected to the blood cells, by using flow cytometry technique, may provide an important tool for SLE diagnosis and activity monitoring [6,7,8].

In the present study levels of R-C4d and P-C4d were highly significantly correlated with clinical activity of SLE. Furthermore, it was observed that the higher SLEDAI-2K index (used to assess SLE activity), the higher was also C4d expression in both blood cells. In other words, a significantly higher expression of R-C4d (FIGURE 2 A, B and C) and P-C4d (Figure 2 D, E and F) was observed in the SLE-A patients. Due to the transience of reticulocytes in the peripheral blood (1-2 days only) high levels of R-C4d may be associated to an immediate state of active disease. Thus, this biomarker would indeed be able to indicate recent SLE activity.

Regarding to P-C4d and according to Navratil et al., 2006, increased levels of C4d bound to platelets may be related to a subset of patients with increased thrombotic tendency, and risk of cardiovascular and cerebrovascular complications. When comparing patients with SLE-I and LES-A, R-C4d and P-C4d levels were significantly higher in patients with active SLE. In patients with SLE-I and NC, a very low expression of R-C4d and P-C4d was observed (FIGURE 3A, B, C, D, E , F, G and H).

Therefore, the level of C4d bound to platelets showed to be effectively associated with activity and clinical worsening of SLE patients.

Since serum C4 test is routinely used in clinical practice to monitor activity in SLE patients, it was investigated whether there was a correlation between serum C4 and C4d bound to the cells, and SLEDAI-2K index. Both levels of R-C4d and P-C4d correlated positive and strongly with the SLEDAI-2K index. Moreover, correlation between SLEDAI-2K and C4, although significant, was weaker and inverse (Table 1). This reinforces the hypothesis that C4d bound to cells such as reticulocytes or platelets, would be a biomarker of increased accuracy for activity of SLE than the molecule in its serum form.

As both biomarkers bound to blood cells were positively correlated with increased SLEDAI-2K (so, SLE activity), the data were analyzed together aiming to establish a cut off point for discrimination of patients with active disease. According to our statistical analysis, values > 20% for R-C4d and > 40% for P-C4d together are related to active disease, since only 1 patient with active disease was found outside of these parameters (95 % of SLE-A patients showed values > 20% for R-C4d and > 40% for P-C4d) (Figure 4 a, B and C).

The data obtained in this study reinforce previous findings related to the evaluation of complement activation products (C4) linked to reticulocytes and platelets as a strong tool to aid in SLE activity detection. While increase in R-C4d levels can be considered as a predictive biomarker of SLE activity, increase in P-C4d levels may indicate risk of thrombotic episodes, in addition to being directly linked to the activity of the disease.

It is worth noting some specific conditions in which C4d linked to blood cells would present potential clinical value. As described in the methodology section, diagnosis of SLE is established based on the criteria proposed by the American College of Rheumatology (ACR). However, according to SATO et al., 2002, existence of SLE patients without fulfilling the minimum criteria established by the ACR is possible. In such cases, use of CB-CAPs in addition to investigation of antinuclear antibodies could contribute as an auxiliary tool to complete the diagnosis, particularly when routine laboratory tests reveal leukopenia, anemia, lymphopenia, thrombocytopenia and

alterations in urinary sediment. Still according to the authors, differential diagnosis between active disease and infection is an important issue, since such a distinction implies in different therapeutic approaches. It is known that SLE pathogenesis involves immune imbalance culminating in increased levels of complement activation products associated with blood cells during periods of active disease. Thus, it can be suggested that the evaluation of CB-CAPS levels may also be useful to discriminate between presence of active disease and infection, since infectious processes are not capable of causing the same effect on the immune system. Particularly in cases of pregnant women with SLE, because of the possibility of acute relapse of disease, evaluation of this biomarker combined with anti-dsDNA presence and / or elevation of their titles, in addition to complement consumption, could help differentiate between disease activity and pre eclampsia. As in pregnant women may occur palmar, facial erythema and arthralgia characterization of SLE activity is hampered. The use of CB-CAPS might also be useful for detecting disease activity periods during which administration of vaccines against pneumococcus and influenza would not be indicated. Considering the potential utility of this biomarker in the management of SLE, especially in specific situations, a comparative study on the specificity of laboratory conventional diagnostic methods, such as anti-dsDNA, and CB-CAPS would be desirable particularly at the diagnosis and periods of disease activity (flares).

The promising results obtained in this study taking advantage of being a non-invasive method (only a small sample of blood is necessary), encourage further studies which can be implemented without major obstacles considering the popularization of flow cytometry technique in most research laboratories. In addition to this, the ease of implementation, low intra and interoperator, and intra and interassay coefficients of variation as previously described by Liu et al., 2005, provide reliability and reproducibility to the technique making it easily adaptable to laboratory monitoring of SLE.

Studies similar to ours may allow a more targeted approach to subsets of SLE patients, as well as aiding stratification of these ones in a more effective manner. Since the biomarkers discussed in this paper may serve as predictors of activity and monitoring of SLE, pharmacotherapeutic approaches can be established in order to prevent

development of new flares (SLE activation) and worsening of SLE. We believe that our findings can strengthen previous studies focused on CB-CAPs and, in particular, provide subsidies for more robust studies in order to identify a subset of patients with active disease or those under specific demands among a SLE population.

In conclusion, levels of both biomarkers were significantly higher in patients with active disease (LES-A) compared to the levels of those with inactive disease (LES-I) and controls. Analysis of the biomarkers data together allowed us to calculate a cutoff potentially useful for discriminating patients with active disease as well as in other specific situations involving patients with systemic lupus erythematosus. However, other studies addressing the same issue are essential for validate the present cutoff.

Acknowledgments

To the Rheumatology Unit staff from Santa Casa Hospital in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, for their valuable collaboration in patient recruitment. To patientes for participating in this study and CNPq, CAPES and FAPEMIG for funding it.

Conflict of interest : The authors of this study declare no conflicts of interest.

5.0 REFERENCES

- [1] Cui Y, Sheng Y, Zhang X. Genetic susceptibility to SLE: recent progress from GWAS. *J Autoimmun.* 2013 Mar;41:25-33.
- [2] Adinolfi A, Valentini E, Calabresi E, Tesei G, Signorini V, Barsotti S, Tani C. One year in review 2016: systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2016 Jul-Aug;34(4):569-74.
- [3] Isenberg D, Rahman A. Systemic lupus erythematosus--2005 annus mirabilis? *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006 Mar;2(3):145-52
- [4] Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. *J Rheumatol.* 2002 Feb;29(2):288-91.

- [5] Robinson WH, Lindstrom TM, Cheung RK, Sokolove J. Mechanistic biomarkers for clinical decision making in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2013; 9:267–276.
- [6] Liu CC, Manzi S, Kao AH, Navratil JS, Ahearn JM. Cell-bound complement biomarkers for systemic lupus erythematosus: from benchtop to bedside. *Rheum Dis Clin North Am.* 2010 Feb;36(1):161-72, x.
- [7] Liu CC, Kao AH, Hawkins DM, Manzi S, Sattar A, Wilson N, Ahearn JM. Lymphocyte-bound complement activation products as biomarkers for diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Clin Transl Sci.* 2009 Aug; 2(4):300-8.
- [8] Liu CC, Manzi S, Kao AH, Navratil JS, Ruffing MJ, Ahearn JM. Reticulocytes bearing C4d as biomarkers of disease activity for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2005 Oct; 52(10):3087-99.
- [9] Manzi S, Navratil JS, Ruffing MJ, Liu CC, Danchenko N, Nilson SE, Krishnaswami S, King DE, Kao AH, Ahearn JM. Measurement of erythrocyte C4d and complement receptor 1 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2004 Nov;50(11):3596-604.
- [10] Navratil JS, Manzi S, Kao AH, Krishnaswami S, Liu CC, Ruffing MJ, Shaw PS, Nilson AC, Dryden ER, Johnson JJ, Ahearn JM. Platelet C4d is highly specific for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006 Feb;54(2):670-4.
- [11] Yee CS, Farewell VT, Isenberg DA, Griffiths B, Teh LS, Bruce IN, Ahmad Y, Rahman A, Prabu A, Akil M, McHugh N, Edwards C, D'Cruz D, Khamashta MA, Gordon C. The use of Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index-2000 to define active disease and minimal clinically meaningful change based on data from a large cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford).* 2011 May;50(5):982-8.
- [12] Lu MM, Wang J, Pan HF, Chen GM, Li J, Cen H, Feng CC, Ye DQ. Increased serum RANTES in patients with systemic lupus erythematosus. ***Rheumatol Int.*** 2012 May;32(5):1231-3.
- [13] Sato, EI; Bonfá, ED; Costallat, LTL; Silva, NA; Brenol, JCT; Santiago, MB; Szajubok, JCM; Rachid Filho, A; Barros, RT; Vasconcelos, M. Brazilian Consensus for the treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Rev. Bras. Reumatol.*, 42(6):362-370, 2002.

Table 1. Clinical characteristics of the patients with SLE

Characteristics	N= 40 results (%)
age, mean +/- sd (range) years	43 +/- 12.18 (18–69)
Clinical manifestations, % positive since SLE diagnosis	
Antinuclear antibodies (fan)	72,3
Arthritis	35,7
Photosensitivity	35,0
Hematologic manifestations	43,0
leukopenia	8,1
Thrombocytopenia	12,3
anemia	10,1
Proteinuria	39,3
Low complement C4	37
Low complement C3	30
Malar rash	29,1
(anti-dna/anti-sm)	18,5
Mucosal ulcers	21,8
Psychosis	9,0
Pleurisy/Pericarditis	6,0
Discoid rash	7,6

Table 2. Correlation between expression of R-C4d, PC4d and C4 serum, versus SLEDAI 2K index using Spearman test.

C4	SLEDAI-2K	r value
R-C4d	P<0.00001	0,759
P-C4d	P<0.00001	0,822
C4 SERUM	P=0,009	-0,421

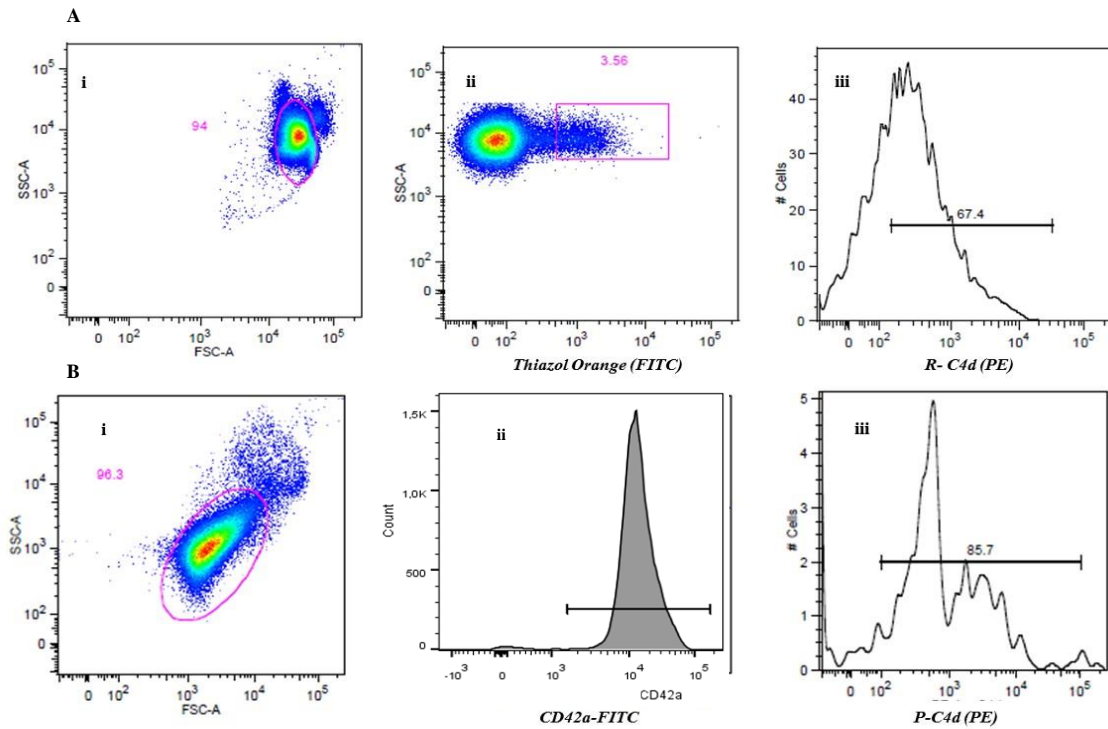


Figure 1. Analysis for R-C4d and P-C4d by flow cytometry. Labelling for R-C4d (Ai, ii and iii). Ai shows erythrocytes and Aii the population of reticulocytes stained by Thiazole Orange. Aiii shows the median fluorescence intensity in a histogram to measure R-C4d expression. Labelling for P-C4d (Bi, ii and iii). Bi shows platelets and Bii the population of platelets stained by CD42aFITC. Biii shows the median fluorescence intensity in a histogram to measure P-C4d expression.

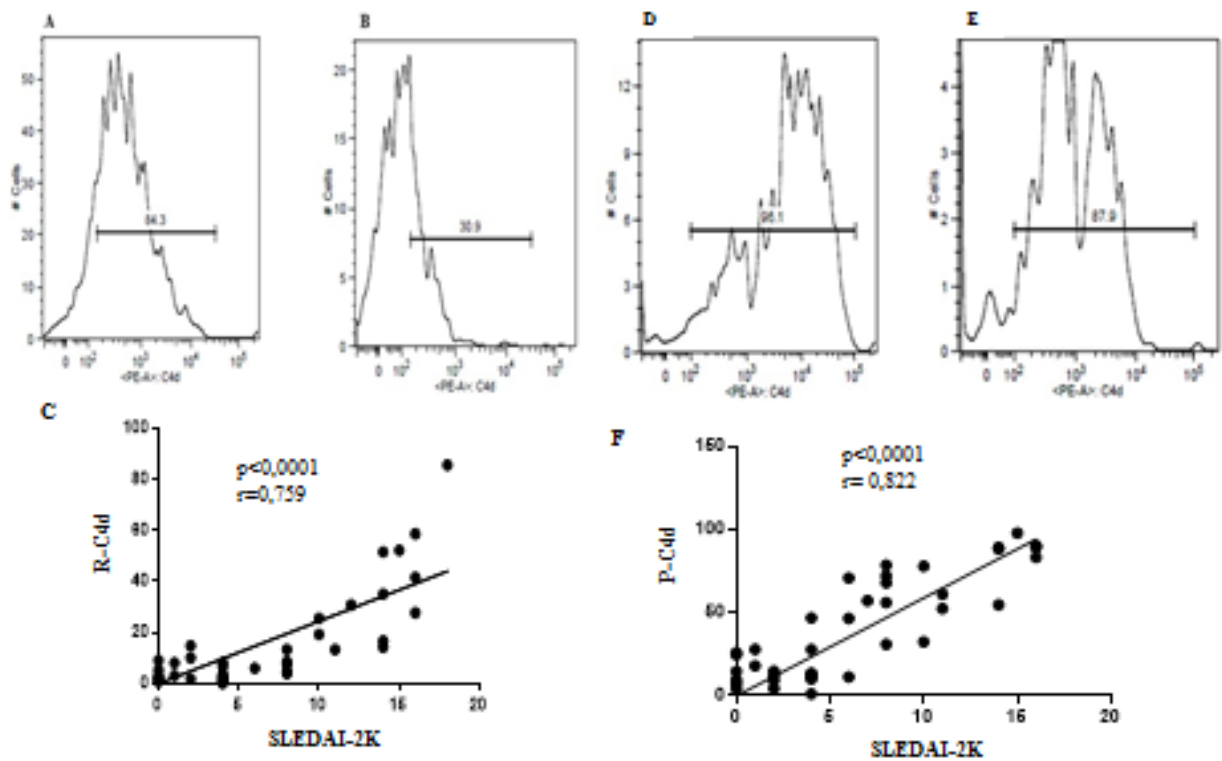


Figure 2. RC4d and PC4d expression and correlation with SLEDAI-2K. Median fluorescence intensity (SMFI) histograms for R-C4d and PC4d in patients with SLE and SLEDAI 2K=18 (A, D) , and SLEDAI-2K= 12 (B, E) obtained by flow cytometry as described in the methodology. Spearman correlation of R-C4d and P-C4d expression by flow cytometry versus SLEDAI 2K values (C, F). P values <0.05 were considered significant.

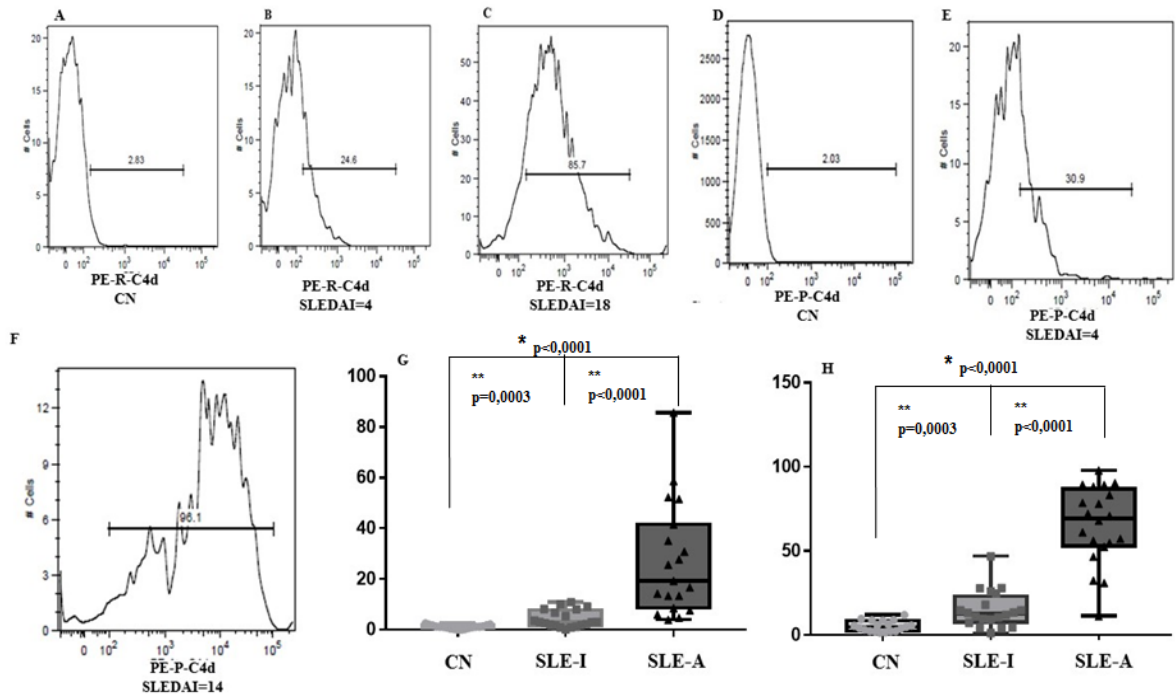


Figure 3. R-C4d expression in controls (NC), in patients with inactive or active SLE. Median fluorescence intensity histograms for R-C4d in controls (A), SLE-I (B), and SLE-A (C). Median fluorescence intensity histograms for P-C4d in controls (D), SLE-I (E), and SLE-A (F). Expression of RC4d (in percentage) in controls and in patients with inactive (SLE-I) or active (SLE-A) disease (G). Expression of PC4d (in percentage) in controls and in patients with inactive (LES-I) or active (SLE-A) disease (H). Kruskal-Wallis (*) and Mann-Whitney (**).

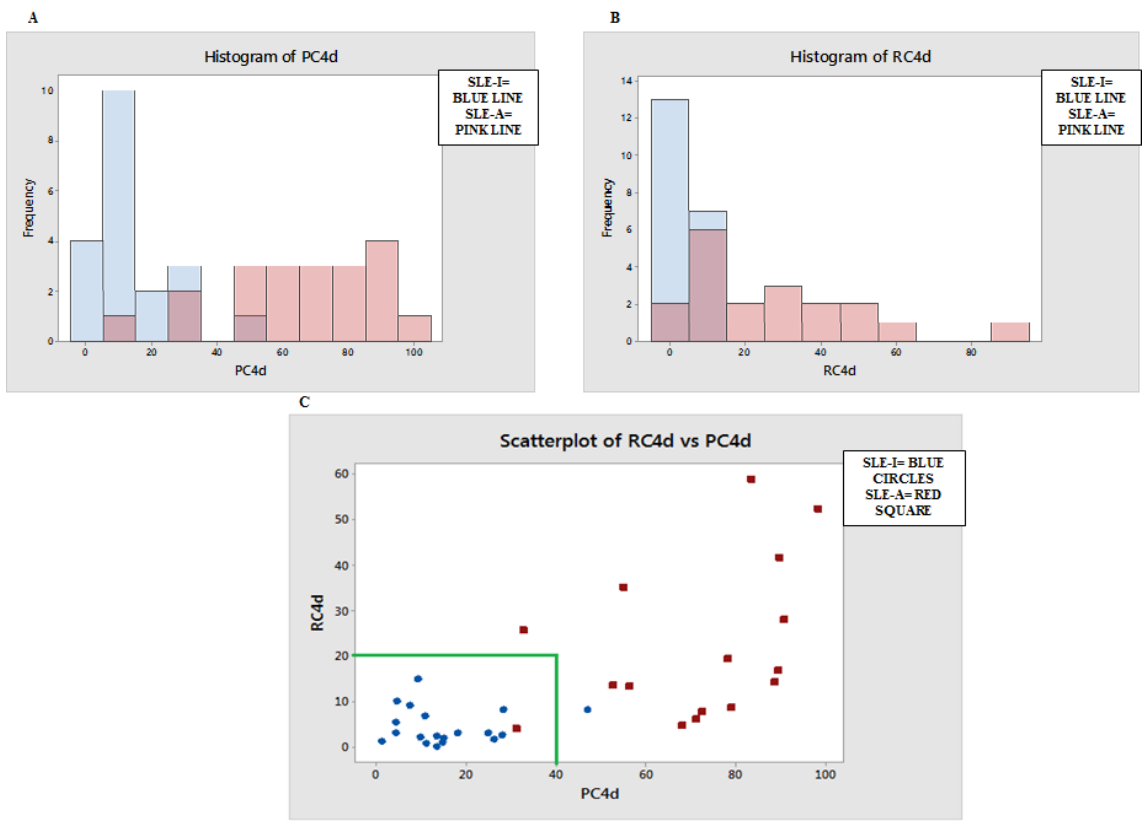


Figure 4. Association between the expression of R-C4d and P-C4d and measurement of a cut-off point for delineation of SLE activity. In A the cutoff point for P-C4d is shown. In B the cutoff point for R-C4d is shown. Figure C shows the association between both points 40% for P-C4d and 20% for R-C4d.

6.3- Artigo 3: APLICAÇÕES DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.

APLICAÇÕES DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

AUTORES: *Karine Silvestre Ferreira¹, Cristina de Mello Gomide Loures¹, Marcos Vinicius Ferreira Silva¹, Walter Batista Cicarini¹, Luan Carlos Vieira¹, Vicente de Paulo Coelho Peixoto Toledo¹, Tânia Mara Pinto Dabés Guimarães¹, Cláudia Lopes Santoro Neiva², Renato Vargas Consoli², Paulo Madureira de Pádua², Maria das Graças Carvalho¹.*

1- Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

2-Serviço de Reumatologia da Santa Casa de Belo Horizonte.

Autor correspondente:

Karine Silvestre Ferreira

Avenida Antônio Carlos, 6627

Federal University of Minas Gerais State

Faculty of Pharmacy

Office 4102 Block 3

Campus Pampulha - Belo Horizonte/ Minas Gerais, Brazil 31270-901

Phone: +55 (31) 3409-6881 FAX: +55 (31) 31 3409-6985

email: ka.silvestre@gmail.com

PALAVRAS CHAVE: Lúpus Eritematoso Sistêmico, biomarcadores, citometria de fluxo.

RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é um distúrbio autoimune de patogênese multifatorial. Diversos métodos laboratoriais são utilizados para se completar o diagnóstico. A citometria de fluxo é uma importante ferramenta porque permite a identificação dos principais tipos celulares envolvidos no desenvolvimento da doença, além de outros marcadores presentes no sangue periférico dos pacientes com LES. Diante da complexidade dos fenômenos imunológicos que ocorrem no LES, os autores se propõem a apresentar uma revisão sucinta quanto as implicações fisiopatológicas da doença com foco nas alterações das populações linfocitárias, células NK e nas alterações da ativação do sistema do complemento observadas no sangue periférico de pacientes com LES quando utilizada a técnica de citometria de fluxo. O uso de novos biomarcadores, identificados por meio dessa técnica, poderá auxiliar no diagnóstico e acompanhamento da atividade da doença, avaliação e predição das características clínicas e estratificação de subtipos de LES, o que certamente reverterá em benefícios aos pacientes.

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disorder of multifactorial pathogenesis. Several laboratory methods are used to complete the diagnosis. Flow cytometry is an important tool because it allows the identification of the main cellular types involved in the development of the disease, in addition to other markers present in the peripheral blood of patients with SLE. In view of the complexity of the immunological phenomena that occur in SLE, the authors propose to present a brief review of the pathophysiological implications of the disease with a focus on the alterations of the lymphocyte populations, NK cells and the changes in the complement system activation observed in the peripheral blood of patients with SLE when using the flow cytometry technique. The use of new biomarkers, identified through this technique, may help in the diagnosis and monitoring of disease activity, evaluation and prediction of clinical characteristics and stratification of SLE subtypes, which will certainly benefit the patients.

INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é um distúrbio autoimune, multissistêmico, de etiologia ainda não bem esclarecida (1). As características da doença incluem a produção de autoanticorpos, presença de células T e B hiper-reativas, a ativação excessiva do sistema de complemento, e a deposição de imunocomplexos em diversos tecidos, os quais podem também ser danificados por fatores locais (2). O LES reflete um desequilíbrio do sistema imune adaptativo envolvendo anormalidades em linfócitos T e B, embora haja evidências da importância do sistema imune inato para patogênese da doença (3).

O LES tem distribuição universal. A maioria dos estudos epidemiológicos sobre o LES vem de diferentes regiões do mundo (4) e dentro do mesmo país as taxas de incidência também mostram acentuadas diferenças (5). No Brasil, estima-se uma incidência de LES em torno de 8,7 casos/100.000 casos/ano, de acordo com um estudo epidemiológico realizado no Nordeste (6). Estudos epidemiológicos realizados nos Estados Unidos detectaram uma prevalência de 14,6 a 50,8 casos/100.000 habitantes (6). A doença acomete indivíduos de todas as raças (7), porém, sua prevalência é três a quatro vezes maior em mulheres negras que brancas. O LES acomete dez a doze mulheres para cada homem afetado. Esse predomínio ocorre em todas as faixas etárias e é mais marcante em mulheres em fase reprodutiva quando comparado a crianças e idosos (8). Na prática clínica atual, o diagnóstico do LES é dificultado pela diversidade das manifestações, por não possuir manifestação patognomônica, ou teste laboratorial sensível e específico. Deve-se suspeitar do diagnóstico de LES em pacientes com manifestações características, como lesões cutâneas típicas, que apresentem comprometimento de múltiplos órgãos ou tenham queixas sistêmicas, sem causa aparente. Utilizam-se os critérios propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR) para a classificação do LES, cujos critérios apresentam sensibilidade e especificidade em torno de 96% (8).

Muitos estudos têm sido realizados visando um maior conhecimento da fisiopatologia desta doença valendo-se de vários métodos laboratoriais. Particularmente, a citometria de fluxo constitui importante suporte para tais estudos, permitindo a fenotipagem e a quantificação de diversos marcadores de interesse em amostras de sangue de pacientes com LES. Tais estudos têm contribuído para elucidar o processo fisiopatológico ainda

pouco compreendido do LES, possibilitando o desenvolvimento de biomarcadores ou alvos terapêuticos a serem utilizados na prática clínica. Diante da complexidade dos fenômenos imunológicos que acontecem no LES, torna-se bastante pertinente revisar alguns aspectos importantes com foco nas alterações das populações linfocitárias, células NK, B e T e nas alterações da ativação do sistema do complemento observadas no sangue periférico de pacientes com LES quando utilizada a técnica de citometria de fluxo, cujos aspectos apresentam implicações fisiopatológicas na doença.

MÉTODOS

Para elaboração do presente trabalho realizou-se um estudo de revisão de literatura entre artigos publicados e disponibilizados nos principais repositórios científicos, como a Biblioteca Virtual em Saúde, Scielo e Pubmed. Foram utilizadas palavras chaves isoladas ou em combinações: Lúpus Eritematoso Sistêmico, biomarcadores e citometria de fluxo. Artigos publicados na íntegra em português e inglês foram selecionados.

REVISÃO DE LITERATURA

FENÓTIPOS LINFOCITÁRIOS

Células NK

As células natural killer (NK) são um importante grupo pertencente à imunidade inata e diferentemente das células B e T não necessitam de sensibilização prévia para serem ativadas. Morfologicamente as células NK são grandes linfócitos granulares que correspondem de 5 a 10% dos linfócitos circulantes (9). Estas possuem a função de vigilância na defesa contra vírus, bactérias intracelulares e células cancerosas por meio de uma atividade diretamente citotóxica ou de secreção de citocinas (9). Células NK medeiam os seus efeitos através do reconhecimento e morte de células alvo e a produção de citocinas, particularmente IFN - γ , que aumentam a resposta imune inata e à resposta imune adaptativa subsequente. Dessa forma, as células NK podem influenciar e regular a atividade tanto da resposta imune inata quanto da imunidade adaptativa. Desde o início da década de 80, vários estudos demonstraram diminuição do número e de atividade das células NK em sangue periférico de pacientes com doenças autoimunes como o LES, a artrite reumatoide, diabetes tipo 1 e síndrome de Sjögren (10). As células NK podem ser distribuídas em dois subgrupos principais com base na densidade

de expressão de CD56 na superfície celular. As células de alta densidade de CD56 são chamadas de CD56^{bright}, representam aproximadamente 10% das células NK circulantes, enquanto as de baixa densidade são chamadas de CD56^{dim}, com aproximadamente 90% destas células, as quais são biologicamente distintas após a ativação (11). As células NK CD56^{bright} proliferam e produzem uma grande variedade de citocinas, como, IFN- γ , fator de necrose tumoral, IL-10 e quimiocinas, mas apresentam uma atividade citotóxica mínima (12, 13). Já as células NK CD56^{dim} apresentam alta expressão do receptor Fc- γ , CD16 e perforina. Dessa forma, possuem alta atividade citotóxica, mas produzem quantidades relativamente menores de citocinas (11).

Estudos prévios, identificaram uma diminuição de células NK e da citotoxicidade em pacientes com LES. Park et al., 2009, observaram que a diferenciação de células NK está prejudicada no LES o que poderia contribuir para as alterações observadas no sistema imune dos pacientes, porém ainda não está elucidada a forma com a qual essas alterações estão relacionadas com a atividade da doença, já que mesmo nos períodos de remissão da doença o número e atividade de células NK circulantes continuam diminuídas. Essas alterações foram observadas de forma mais proeminentes em pacientes com as manifestações de nefrite lúpica ou com trombocitopenia. Hervier et al., 2011 não observaram diferenças na relação entre as populações de células NK CD56^{bright} e NK CD56^{dim} entre os grupos com LES e controle, indicando não haver um predomínio entre as atividades modulatória ou citotóxica das células NK.

De acordo com Tian et al., 2012, as células NK poderiam limitar as respostas autoimunes por inibir a proliferação e ativação de linfócitos autorreativos ou por eliminar células dendríticas imaturas. A resposta das células NK origina a partir do equilíbrio entre sinais de ativação e inibição por receptores expressos na superfície celular (16). Se há um favorecimento para-inibição, os estímulos para a ativação celular não geram resposta. No entanto, se há favorecimento para ativação, então as células NK passam por alterações intracelulares para exercerem sua função (16). Em um estado não patológico, os receptores inibitórios como os *killer cell immunoglobulin-like* (KIRs), *immunoglobulin-like transcript 2* (ILT-2) e o receptor heterodimérico CD94/NKG2A reconhecem as moléculas expressas pelo complexo maior de histocompatibilidade de classe I (MHC-1). Porém a ativação não ocorre apenas na ausência de reconhecimento das moléculas expressas pelo MHC de classe I, mas também são necessárias ações de

receptores de ativação, entre esses, o CD16, NKG2C, NKG2D e os receptores de citotoxicidade natural NKp30, NKp44, NKp46 e NKp80 (13). Segundo Shepis et al., 2009, a expressão dos receptores NKp46 se encontram aumentados em pacientes com lúpus em relação ao controle. Hervier et al., 2011, observou um aumento na expressão do NKG2A e uma diminuição da expressão dos receptores CD16 e KIR. Perante esses resultados observados, é difícil concluir se existe uma tendência para as células NK se encontrarem em um estado ativado ou inibido. Para melhor elucidação da relação entre a expressão dos receptores de ativação ou inibição ainda são necessários estudos complementares em pacientes portadores de LES.

Células NKt

Entre as células T CD3⁺ existe uma pequena fração que expressa o marcador de células NK, CD56, e formam a população CD3⁺CD56⁺, conhecida como NKt. As células NKt constituem uma população heterogênea consistindo de células CD4, CD8, duplo negativa ou duplo positiva (18,19). Quando ativadas essas células produzem citocinas pró-inflamatórias e degranulam granzimas ou outros componentes citotóxicos (20). Cho et al., 2011 e Riccieri et al., 2000, observaram que a população de células NKt se encontra diminuída e com função prejudicada em pacientes com LES e essa redução se correlaciona com a atividade da doença. As células NKt apresentam várias subpopulações, entre essas, uma subpopulação que expressa CD1d, conhecida como células NKt invariantes (iNKt), que é altamente produtora de citocinas como IL-4 e IFN- γ , cuja redução contribuiria para um desequilíbrio nas respostas efetoras de células do tipo Th1 ou Th2 e, dessa forma, promoveria um aumento da atividade da doença (23). A redução dessa população também está associada a uma maior produção de IgG e anti-DNA dupla-fita (devido ao estímulo a diferenciação Th1 e maior sinalização para células B (24).

Células T

A importância das células T no LES é bem documentada na literatura. Segundo Zhao et al., 2013, o entendimento sobre as alterações que ocorrem nas células T é de vital importância para elucidar a fisiopatologia do LES. Em indivíduos não lúpicos uma pequena fração das células T CD3⁺ do sangue periférico não expressa CD4 ou CD8 (duplo negativo), mas estão significativamente expandidas em pacientes com LES. A origem ou função dessas células ainda é pobremente conhecida (26). Sieling et al.,

2000, descreveram um aumento dessa população de células nos pacientes com LES, com capacidade de produzir IL-4 e induzir à produção de imunoglobulinas e anticorpos anti-DNA dupla-fita em células B. Segundo Crispin et al., 2008, essa população também produziria altos níveis de IL-17 que é uma poderosa citocina pró-inflamatória e promoveria a infiltração de células polimorfonucleares em rins de pacientes com nefrite lúpica. Estudos com células purificadas de pacientes com LES indicam que as células T ativadas induzem a proliferação de células T duplo negativo e que essas apresentam mais receptores de ativação na superfície que as células T CD4 ou T CD8 (29,28). Segundo Crispin et al., 2009, as células T CD3⁺ que não expressam CD4 ou CD8 podem ser originalmente células T CD8⁺ que deixaram de expressar as moléculas de superfície CD8.

O percentual de células T CD8⁺ ativadas se encontra aumentado nos pacientes com LES em relação a indivíduos controle (30,31). Apesar do importante papel dessa população na defesa contra agentes virais, o papel das células T CD8 não está claro no LES (25). Li et al., 2010, relataram que esse aumento na população de células T CD8⁺ é formado em parte por células T CD8⁺ do tipo $\gamma\delta$ que auxiliam na ativação das células T CD4⁺. Blanco et al., 2005 observaram um aumento na produção de granzima B e perforina em células T CD8⁺ em pacientes com LES e este aumento correlaciona com a atividade da doença. O mecanismo que leva à alta ativação das células T CD8⁺ pode ser consequência da ação de células dendríticas que, em função da presença de imunocomplexos, levam a uma apresentação cruzada desses antígenos causando um aumento no número das células T CD8⁺ ativadas (33). Em pacientes com LES é observada uma diminuição do percentual de células T CD4⁺ e na relação entre CD4/CD8 (32,34). A principal função das células T CD4⁺ é modular a imunidade adaptativa através da secreção de citocinas, regular a resposta de células T CD8⁺ e participar na diferenciação das células B em células secretoras de anticorpos (34). Estudos realizados em humanos e modelos murinos do lúpus indicam que a produção de anticorpos por células B autoreativas é promovida com a ajuda de células T CD4⁺ (35). Segundo Basu et al., 2009, o receptor de imunoglobulinas de células NK (KIR) é expresso de forma aberrante em células T CD4⁺ e T CD8⁺ de pacientes com LES, cuja expressão possui correlação com o índice de atividade da doença, sendo um potencial biomarcador da mesma. Outro potencial biomarcador estudado no LES advém de uma

grande expansão da subpopulação de células T CD4⁺ que expressam o receptor NKG2D e apresentam atividade reguladora em pacientes com LES juvenil. A frequência dessas células com características regulatórias se correlaciona com a ausência da atividade da doença (36). Nem todas as células T CD4 são do tipo auxiliar (helper) e também podem exibir um potencial de autoagressão através de contato com outras células, além de secretarem perforina e granzima B o que causa morte da célula alvo por apoptose (36). O desequilíbrio no número de células T CD4⁺ auxiliares (Th) e a deficiência das células T reguladoras (Treg) está envolvido na patogênese do LES. As células Th são definidas como células Th1, Th2 ou Th17 e são caracterizadas pela produção de citocinas. As células Th1 secretam IFN- γ , as células Th2 a IL-4, e as Th17, secretam IL-17. Vários estudos tem mostrado que alterações no perfil de Th1/Th2 contribuem para a patogênese da doença (35). Porém, apesar da dicotomia entre perfis Th1 e Th2 serem capazes de explicar aspectos imunológicos no controle de diversos patógenos e alergias, este modelo apresentava limitações no estudo de doenças autoimunes. No caso do LES, alguns estudos mostraram um aumento das citocinas IFN- γ e IL-4 (35) ou mesmo diminuição de células Th1 e um aumento de células Th2 em sangue periférico de pacientes com LES (37). No entanto, foram observados em pacientes com LES níveis elevados de citocinas como IL-12, TNF- α e IFN- γ que favorecem uma resposta do tipo Th1(38). Outros estudos apontam para um aumento na população de células Th17 e na concentração de IL-17 em sangue periférico de pacientes com LES durante os períodos de alta atividade da doença (39). O nível de IL-17 circulante correlaciona com a atividade da doença e é maior em pacientes com nefrite lúpica (35). Outros autores não observaram diferenças significativas na frequência das células Th17 entre os grupos de pacientes e o grupo controle, no entanto foi observado um aumento de uma subpopulação de células Th17 que além de produzirem IL-17A também produzem IFN- γ (40). Esse achado aponta para um papel sinérgico entre as citocinas IL-17A e IFN- γ na manutenção do quadro inflamatório (41). A funcionalidade dessa população que compartilha características tanto Th1 quanto TH17 indica uma plasticidade decorrente da condição do ambiente em que a célula se encontra (40).

As células T reguladoras (Treg) são especializadas na supressão de células T efectoras e são importantes na manutenção da própria tolerância. Em humanos, as células Treg constituem em média de 1 a 2 % das células T do tipo CD4 no sangue periférico (42).

Essas células possuem a ação de suprimir as respostas de células T autorreativas e previnem respostas imunes exuberantes dirigidas contra antígenos externos, portanto, quando seu número ou função está diminuído favorece o desenvolvimento de doenças autoimunes (43). Além disso, observou-se que o número de células Treg apresenta uma correlação inversa com os níveis de anticorpos anti-DNA, não ocorrendo o mesmo com níveis de fatores do complemento (42). As células T reguladoras exercem parte de sua função por meio da secreção de TGF- β 1 que é uma importante citocina que apresenta ação imunossupressiva (44). Sabe-se que a diferenciação de células T para células Treg ou Th17 depende da ação de TGF- β que, quando sob ação em conjunto de IL-6 e IL-21 promove a diferenciação para a linhagem de células TH17 (44). Porém, quando a ação do TGF- β está em conjunto com IL-2 há um favorecimento para a manutenção e proliferação das células Treg (45). Nos últimos anos, estudos envolvendo Treg foram realizados por vários grupos, porém os resultados sobre o desequilíbrio nas células Treg ainda são inconclusivos (46). Vários estudos descrevem números reduzidos e função prejudicada nas células Treg no LES (25,42). Já outros estudos falharam em observar essas alterações (47), no entanto foi observada resistência da célula T efetora à ação regulatória das células Treg (48). Possivelmente a falta de consistência dos resultados da literatura se justifica pelo fato da investigação ocorrer em fases distintas da doença e com pacientes sob tratamento.

Células B

Evidências demonstram um papel primário das células B no desenvolvimento do LES. Modelos animais com deficiência de células B não desenvolvem a doença. O LES ativo está associado ao quadro de aumento da atividade de células B e também à expansão de certos tipos celulares como células B imaturas ou transicionais, células B de memória, plasmoblastos e plasmócitos (49). Em adição, já foram documentadas a hiperreatividade de células B e produção espontânea de anticorpos no LES por meio de mecanismos ainda não elucidados (49,50). Os estudos por meio do uso da técnica GWAS (*genome-wide association study*) identificaram que os genes BANK1, BLK, IL-21R, CD40, Lyn, PTPN22, TNFAIP3, Fc γ Rs, e Blimp-1 estão associados ao LES e a outras doenças autoimunes e podem predispor a um aumento da resposta das células B (49). Apesar de serem mais conhecidas pela produção de anticorpos, as células B apresentam uma profunda influência na resposta imune celular devido à produção de

citocinas, além da interação direta com células T e células dendríticas (50). As células B ainda possuem alta eficiência na apresentação de antígenos, são capazes de capturar antígenos via receptores de superfície e apresentar essas moléculas através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classes I e II e a apresentação de autoantígenos ativa as células T autorreativas. Além disso, as células B regulam as células T, as células de memória, e o desenvolvimento e ativação de células dendríticas (51). Células B também possuem a capacidade de modular algumas respostas celulares por meio da liberação de citocinas como o *B lymphocyte stimulator* (BLys ou BAFF) que é responsável pela sobrevivência das células B nos centros germinativos (52). Moléculas co-estimulatórias de ativação de células B como CD80 e CD86 se encontram aumentadas em pacientes com LES (30). Segundo, Chang et al., 2008, o aumento das moléculas co-estimulatórias de ativação de células B como o CD86 ocorrem em células do tipo naïve e em células de memória o que sugere um defeito intrínseco nas células B dos pacientes.

Jacobi et al., 2003, observaram em células do sangue periférico de pacientes com LES um aumento na frequência da população de plasmócitos CD27^{high} e esse aumento está correlacionado com o aumento da atividade da doença e, após tratamento adequado, essa população celular diminuiu. A expansão dos plasmócitos CD27^{high} está associada com a presença dos anticorpos anti-DNA ds, anti-Ro, anti-La, anti-SM e anti-histonas (53,54).

PRODUTOS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema de complemento engloba um grupo de proteínas do plasma e de membrana que formam três vias distintas (clássica, alternativa e das lectinas) e atuam na proteção do hospedeiro contra agentes patogênicos estranhos. A via clássica é ativada por imunocomplexos. É dependente de anticorpos, mas somente após complexação com o antígeno. A via alternativa é espontaneamente gerada quando os componentes do complemento se ligam a superfícies de organismos invasores, ao passo que a via das lectinas é acionada quando lectinas ligadoras de manose se ligam a resíduos de manose e de outros açúcares que recobrem a superfície de muitos patógenos. Em geral, a reação em cascata de ativação do sistema complemento, consegue gerar fragmentos

quimiotáticos capazes de atrair células inflamatórias, induzir a produção e liberação de mediadores inflamatórios, bem como marcar microrganismos para que os mesmos sejam prontamente fagocitados pelos neutrófilos e monócitos (55,56 e 57).

Porém, a ativação do sistema complemento pode conduzir a respostas imunológicas não apenas fisiológicas, mas também patológicas com múltiplos danos imuno-inflamatórios em diferentes tecidos. Algumas das respostas inflamatórias associadas ao LES podem ser induzidas pela ativação patológica do sistema complemento. No LES a presença de autoanticorpos que formam imunocomplexos são capazes de ativar componentes do sistema complemento através de sua via clássica e pode-se inferir que as proteínas do complemento sejam consumidas em uma extensão proporcional à atividade da doença. Assim, as quantificações das frações C3 e C4 do sistema de complemento têm sido historicamente vistas como testes de laboratório "padrão ouro" para o LES. O decréscimo de C3 e C4 no soro de pacientes portadores de LES indicam aumento da inflamação e atividade da doença. Porém existe uma vasta gama de variação dos níveis séricos de C3 e C4 entre os indivíduos saudáveis, sendo que esta variação é sobreposta em pacientes com LES. Outra desvantagem é que os testes laboratoriais utilizados medem a concentração sérica de C3 e C4 (moléculas solúveis possuem vida curta no plasma e podem sofrer processos de hidrólise) em detrimento de produtos de ativação do complemento. E finalmente, a resposta de fase aguda durante a inflamação pode levar a um aumento de síntese de C3 e C4, além do que, as deficiências parciais de C4, estão comumente presentes na população em geral (55,56 e 57).

Proteínas do complemento inativas estão presentes na circulação e nos tecidos podendo interagir com células (eritrócitos e linfócitos) ou tecidos (células endoteliais). É concebível que produtos de ativação do complemento gerados durante períodos de atividade do LES, possam acompanhar várias células circulantes e teciduais bem como alterar funções fisiológicas das mesmas (55,56 e 57).

Os produtos de ativação C3 e C4 do sistema de complemento contêm ligações tioéster capazes de interagir de forma covalente com proteínas de membrana de células circulantes, sendo que várias células hematopoiéticas expressam esses receptores para fragmentos proteolíticos gerados durante a ativação do complemento (57).

Portanto, para o LES, os componentes do sistema de complemento ligados às células podem ser potenciais biomarcadores, muito mais confiáveis do que proteínas do

complemento solúveis. Dentro desse contexto, a descoberta e validação de produtos de ativação do complemento ligados a células (CB-CAP= *Cell -bound complement activation products*) como potenciais biomarcadores do LES podem ser importantes ferramentas para o melhor entendimento da fisiopatologia e do controle clínico dessa doença (57).

Por meio da metodologia da citometria de fluxo, têm sido identificados diferentes CB-CAPs em células hematológicas circulantes com alta especificidade para o LES (58,55,59,56 e 57).

Liu et al., 2011, consideraram o grande número e a localização dos eritrócitos (provenientes do sangue periférico e medula óssea), poderiam servir como marcadores biológicos da condição inflamatória in vivo e, portanto, da atividade da doença em pacientes com LES Outro fato conhecido, é o de que eritrócitos se desenvolvem a partir de células tronco hematopoéticas na medula óssea e emergem como reticulócitos, com características fenotípicas distintas por 1 a 2 dias antes de completarem seu amadurecimento para eritrócitos. Tal fato permitiu aventar a hipótese que reticulócitos liberados na corrente circulatória durante um estado de doença ativa podem ter sido imediatamente expostos a fragmentos derivados de C4 gerados a partir da ativação do complemento, ocorrendo em seguida à ligação destes fragmentos aos precursores eritrocitários (R-C4d = Reticulócitos - C4d). Dessa forma, tem sido hipotetizado que os níveis de R-C4d podem ser considerados biomarcadores preditivos e refletir precocemente a atividade da doença em um dado paciente em um determinado momento (57). O curso natural do LES consiste de episódios intermitentes da doença, com recaídas e remissões que podem estar correlacionadas com a extensão das reações inflamatórias envolvendo componentes do sistema de complemento (57).

Observações até a presente data sugerem que CB-CAPS associados a um tipo particular de célula podem fornecer pistas e informações para estratificação clínica de pacientes portadores de LES (57).

De acordo com estudo desenvolvido por Navratil et al., 2006, pacientes positivos para P-C4d (C4d ligado à plaqueta) apresentaram uma maior frequência de eventos cardiovasculares associados com trombose do que pacientes negativos para P-C4d. De fato, estudos longitudinais analisados em conjunto pelo mesmo autor sugerem que pacientes com LES com níveis anormais de P-C4d podem representar um subgrupo de

pacientes com tendência trombótica aumentada e risco de complicações cardiovasculares e cerebrovasculares (59). Tendo em vista o papel biológico das plaquetas na hemostasia e coagulação, pode-se correlacionar a presença de níveis anormais de CB-CAPS sobre as mesmas como biomarcadores de tendência trombótica aumentada em pacientes com LES.

Para o desenvolvimento de associações entre os fenótipos de CB-CAPS e outras células circulantes (por exemplo, linfócitos) e as manifestações clínicas do LES ainda são necessários estudos adicionais (59).

O uso da citometria de fluxo contribui para elucidação dos mecanismos fisiopatológicos e na identificação de novos biomarcadores. Os mecanismos envolvidos no processo de agravamento do LES e sua morbidade são ainda pouco compreendidos. O estudo de novos biomarcadores é importante para uma abordagem mais adequada aos pacientes portadores dessa doença de manifestações tão heterogêneas. Além do mais, tais biomarcadores poderão servir como preditores da atividade do LES e, dessa forma, permitir a adoção de medidas farmacoterapêuticas para prevenir a evolução da doença.

CONCLUSÃO

À luz do exposto acima, a citometria de fluxo, importante técnica para elucidação dos processos fisiopatológicos das doenças autoimunes, também contribui na identificação de novos biomarcadores que auxiliaria no diagnóstico e monitoração da atividade da doença, avaliação e predição das características clínicas e estratificação de subtipos de LES. Entretanto, outros estudos envolvendo diferentes pacientes, com nefrite lúpica ou não, tratados ou não, oriundos de outras partes do mundo, necessitam ser desenvolvidos para esclarecer o real papel destes novos biomarcadores. A busca por novos parâmetros imunológicos e hematológicos que possam caracterizar diferenças fisiopatológicas entre pacientes com LES e outras doenças autoimunes, faz-se ainda necessária para compreensão da dinâmica dessa complexa doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- CUI, Y. et al. Genetic susceptibility to SLE: recent progress from GWAS. **J Autoimmun**, v. 41, p. 25-33, 2013.
- 2-AHEARN, J. M. et al. Biomarkers for systemic lupus erythematosus. **Transl Res**, v. 159, n. 4, p. 326-42, 2012.
- 3-APOSTOLIDIS, S. A. et al. The dysregulation of cytokine networks in systemic lupus erythematosus. **J Interferon Cytokine Res**, v. 31, n. 10, p. 769-79, 2011.
- 4-HOPKINSON, N. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis** 1992; 51:1292-4.
- 5-MCCARTY, D.J. et al. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. **Arthritis Rheum** 1995; 38:1260-70.
- 6-VILAR, M.J., SATO, E.I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). **Lupus**. 2003.
- 7-D'CRUZ, D.P., et al. Systemic lupus erythematosus. **Lancet**. 2007 Feb 17;369(9561):587-96.
- 8-TEIXEIRA J. G., et al. Aplicação dos critérios diagnósticos do lúpus eritematoso sistêmico em pacientes com hanseníase multibacilar. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2011 Feb; 44(1): 85-90.
- 9-KWONG, K.Y., et al. Generation, affinity maturation, and characterization of a human anti-human NKG2D monoclonal antibody with dual antagonistic and agonistic activity. **J Mol Biol**. 2008 Dec 31;384(5):1143-56.
- 10- SCHLEINITZ, N., et al. Natural killer cells in human autoimmune diseases. **Immunology**, v. 131, n. 4, p. 451-8, 2010.

11- YAP, D. Y. H., et al. Cytokines and Their Roles in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus: From Basics to Recent Advances. **BioMed Research International**, v. 2010, 2010.

12- COOPER, M. A., et al. The biology of human natural killer-cell subsets. **Trends Immunol**, v. 22, n. 11, p. 633-40, 2001.

13-HERVIER, B. et al. Phenotype and function of natural killer cells in systemic lupus erythematosus: Excess interferon- γ production in patients with active disease. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 6, p. 1698-1706, 2011.

14-PARK, Y. W. et al. Impaired differentiation and cytotoxicity of natural killer cells in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 6, p. 1753-63, 2009.

15-TIAN, Z.; GERSHWIN, M. E.; ZHANG, C. Regulatory NK cells in autoimmune disease. **J Autoimmun**, v. 39, n. 3, p. 206-15, 2012

16-ORANGE, J. S.; BALLAS, Z. K. Natural killer cells in human health and disease. **Clin Immunol**, v. 118, n. 1, p. 1-10, 2006.

17- SCHEPIS, D., et al. Increased proportion of CD56bright natural killer cells in active and inactive systemic lupus erythematosus. **Immunology**, v. 126, n. 1, p. 140-146, 2009.

18-GREEN, M. R. et al. Natural killer cell activity in families of patients with systemic lupus erythematosus: demonstration of a killing defect in patients. **Clin Exp Immunol**, v. 141, n. 1, p. 165-73, 2005.

19-FOSTER, M. H., et al. T cells and B cells in Lupus Nephritis. **Semin Nephrol**, v. 27, n. 1, p. 47-58, 2007.

20-GUO, H., et al. High frequency of activated natural killer and natural killer T-cells in patients with new onset of type 2 diabetes mellitus. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 237, n. 5, p. 556-62, 2012.

21- CHO, Y. N., et al. Numerical and functional deficiencies of natural killer T cells in systemic lupus erythematosus: their deficiency related to disease activity. **Rheumatology (Oxford)**, v. 50, n. 6, p. 1054-63, Jun 2011.

22-RICCIERI, V., et al. Down-regulation of natural killer cells and of gamma/delta T cells in systemic lupus erythematosus. Does it correlate to autoimmunity and to laboratory indices of disease activity? **Lupus**, v. 9, n. 5, p. 333-7, 2000.

23-MAJOR, A. S. et al. The role of invariant natural killer T cells in lupus and atherogenesis. **Immunol Res**, v. 34, n. 1, p. 49-66, 2006.

24- CHUANG, Y. P., et al. Modulatory function of invariant natural killer T cells in systemic lupus erythematosus. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 478429, 2012.

25-ZHAO, M., et al. E4BP4 overexpression: a protective mechanism in CD4+ T cells from SLE patients. **J Autoimmun**, v. 41, p. 152-60, 2013.

26-CRISPIN, J. C., TSOKOS, G. C. Human TCR- $\alpha\beta$ + CD4- CD8- T Cells Can Derive from CD8+ T Cells and Display an Inflammatory Effector Phenotype1. **J Immunol**, v. 183, n. 7, p. 4675-81, 2009. ISSN 0022-1767 (Print)1550-6606 (Electronic).

27- SIELING, P. A., et al. Human Double-Negative T Cells in Systemic Lupus Erythematosus Provide Help for IgG and Are Restricted by CD1c. **J. Immunol**, v. 165, p. 5338 - 5344, 2000.

28- CRISPIN, J. C., et al. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. **J Immunol**, v. 181, n. 12, p. 8761-6, 2008.

29- DEAN, G.S., et al. Characterization of CD3+ CD4- CD8- (double negative) T cells in patients with systemic lupus erythematosus: production of IL-4. **Lupus**. 2002;11(8):501-7.

30- BIJL, M. et al. Fas expression on peripheral blood lymphocytes in systemic lupus erythematosus (SLE): relation to lymphocyte activation and disease activity. **Lupus**, v. 10, n. 12, p. 866-72, 2001.

31-WOUTERS, C. H. et al. The circulating lymphocyte profiles in patients with discoid lupus erythematosus and systemic lupus erythematosus suggest a pathogenetic relationship. **Br J Dermatol**, v. 150, n. 4, p. 693-700, 2004.

32-LI, W. X., et al. Assay of T- and NK-cell subsets and the expression of NKG2A and NKG2D in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. **Clin Rheumatol**, v. 29, n. 3, p. 315-23, 2010.

33- BLANCO, P., et al. Increase in activated CD8+ T lymphocytes expressing perforin and granzyme B correlates with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 52, n. 1, p. 201-11, 2005.

34-DACA, A., et al. Two systemic lupus erythematosus (SLE) global disease activity indexes--the SLE Disease Activity Index and the Systemic Lupus Activity Measure--demonstrate different correlations with activation of peripheral blood CD4+ T cells. **Hum Immunol**, v. 72, n. 12, p. 1160-7, 2011.

35-SHIN, M. S.; LEE, N.; KANG, I. Effector T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: update focusing on Th17 cells. **Curr Opin Rheumatol**, v. 23, n. 5, p. 444-8, 2011.

36-DAI, R., AHMED, S. A. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. **Transl Res**, v. 157, n. 4, p. 163-79, 2011.

37-COZ, C., et al. Circulating TFH Subset Distribution Is Strongly Affected in Lupus Patients with an Active Disease. **PLoS One**, v. 8, n. 9, 2013.

38- YU, S. L., et al. Immunopathological roles of cytokines, chemokines, signaling molecules, and pattern-recognition receptors in systemic lupus erythematosus. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 715190, 2012.

39-CHEN D.Y., et al. Th17-related cytokines in systemic lupus erythematosus patients with dilated cardiomyopathies: a possible linkage to parvovirus B19 infection. **PLoS One**. 2014 Dec 2;9(12)

40- HENRIQUES A., et al. Frequency and functional activity of Th17, Tc17 and other T-cell subsets in Systemic Lupus Erythematosus. **Cell Immunol**. 2010;264(1):97–103.

41- TALAAT, R.M., et al. “Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: correlation with disease activity,” **Cytokine**, vol. 72, no. 2, pp. 146–153, 2015.

42-BONELLI, M., et al. Phenotypic and functional analysis of CD4+ CD25- Foxp3+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus. **J Immunol**, v. 182, n. 3, p. 1689-95, 2009.

43- SATAKE, A., et al. Differential targeting of IL-2 and T cell receptor signaling pathways selectively expands regulatory T cells while inhibiting conventional T cells. **J Autoimmun**, v. 44, p. 13-20, 2013.

44- XING, Q., et al. Elevated Th17 cells are accompanied by FoxP3+ Treg cells decrease in patients with lupus nephritis. **Rheumatol Int**, v. 32, n. 4, p. 949-58, 2012

- 45-KLECZYNSKA, W., et al. Imbalance between Th17 and regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 49, n. 4, p. 646-53, 2011..
- 46- DOLFF, S., et al. Disturbed Th1, Th2, Th17 and T(reg) balance in patients with systemic lupus erythematosus. **Clin Immunol**, v. 141, n. 2, p. 197-204, 2011.
- 47-ALUNNO, A., et al. Balance between Regulatory T and Th17 Cells in Systemic Lupus Erythematosus: The Old and the New. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.
- 48-. DORNER T., et al. Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE. **Arthritis Res Ther** 2011;13:243.
- 49- MOK, M. Y., et al. The immunological basis of B-cell therapy in systemic lupus erythematosus. **Int J Rheum Dis**, v. 13, n. 1, p. 3-11, 2010.
- 50- ANOLIK, J.H. B cell biology and dysfunction in SLE. **Bull NYU Hosp Jt Dis**. 2007;65(3):182-6. Review.
- 51-TREANOR B. B-cell receptor: from resting state to activate. **Immunology**. 2012 May;136(1):21-7.
- 52- CHANG, N. H., et al. Expanded population of activated antigen-engaged cells within the naive B cell compartment of patients with systemic lupus erythematosus. **J Immunol**, v. 180, n. 2, p. 1276-84, 2008.
- 53-JACOBI, AM., et al. Correlation between circulating CD27^{high} plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**. 2003 May;48(5):1332-42.

54- SCIASCIA, S., et al. SYSTEMIC LUPUS erythematosus and infections: clinical importance of conventional and upcoming biomarkers. **Autoimmun Rev.** 2012 Dec;12(2):157-63.

55- LIU, C.C. et al. Reticulocytes bearing C4d as biomarkers of disease activity for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.** 2005 Oct;52(10):3087-99.

56-LIU, C.C. et al. Lymphocyte-bound complement activation products as biomarkers for diagnosis of systemic lupus erythematosus. **Clin Transl Sci.** 2009 Aug;2(4):300-8.

57- LIU, C.C. et al. Cell-bound complement biomarkers for systemic lupus erythematosus: from benchtop to bedside. **Rheum Dis Clin North Am.** 2011

58-MANZI, S. et al. Measurement of erythrocyte C4d and complement receptor 1 in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.** 2004 Nov;50(11):3596-604.

59-NAVRATIL J.S. et al. Platelet C4d is highly specific for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.** 2006 Feb;54(2):670-4. Erratum in: **Arthritis Rheum.** 2006 Jun;54(6):2009.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos aos órgãos financiadores da Pós-Graduação no Brasil, particularmente CAPES, CNPq e FAPEMIG pela concessão de bolsas aos alunos envolvidos nesta revisão.

6.4- *Artigo 4:* CORRELATION BETWEEN ACTIVE DISEASE AND HYPERCOAGULABILITY STATE IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSOUS.

CORRELATION BETWEEN ACTIVE DISEASE AND HYPERCOAGULABILITY STATE IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS.

Karine Silvestre Ferreira¹, Walter Batista Cicarini¹, Cristina de Mello Gomide Loures¹, Fernanda Magalhães Freire Campos¹, Marcos Vinicius Ferreira Silva¹, Luan Carlos Vieira¹, Vicente de Paulo Coelho Peixoto Toledo¹, Cláudia Lopes Santoro Neiva², Renato Vargas Consoli², Paulo Madureira de Pádua², Edna Afonso Reis³, Maria das Graças Carvalho¹.

1 Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

2 Serviço de Reumatologia, Santa Casa/BH, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

3 Departamento de Estatística do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Corresponding author:

Karine Silvestre Ferreira

Avenida Antônio Carlos, 6627

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Farmácia

Sala 4102 Bloco 3

Campus Pampulha - Belo Horizonte/ Minas Gerais, Brazil 31270-901

Phone: +55 (31) 3409-6881 FAX: +55 (31) 31 3409-6985

email: ka.silvestre@gmail.com

ORIGINAL ARTICLE

KEYWORDS: CELL BOUND COMPLEMENT C4d, RETICULOCYTES, PLATELETS, HYPERCOAGULABILITY.

Abstract

Determining cell-bound complement activation products (CB-CAPs), such as C4d linked to reticulocytes and to platelets (R-C4d and P-C4d), are potential biomarkers of the activation state of systemic lupus erythematosus (R-C4d) and the state of hypercoagulability (P-C4d). Patients with lupus are known to have an increased risk for arterial disorders and venous thrombosis, which is an important cause of morbidity and mortality in this disease. Objective: The present study aims to answer whether high levels of R-C4d and P-C4d reflecting the recent activity of LES, are correlated to levels of important components for the natural anticoagulation (Protein S and C4BP) and of markers of coagulation activation (D-dimer) and of endothelial lesions (Thrombomodulin), and if they are correlated to the SLEDAI-2K index. Methods: The activity of the disease was defined by the clinical index (SLEDAI-2K). This study included women with similar age distributed in three groups: Group 1: healthy women (control, n = 30); Group 2: women with low activity of the disease (SLEDAI 2K \leq 4, n = 30); Group 3: women with an active disease (high or moderate activity) (SLEDAI 2K > 4, n = 30). Whole blood samples were diluted in PBS and prepared for analysis in flow cytometry. The endothelial injury and the state of hypercoagulability were evaluated by the amount of Thrombomodulin and D-dimer in citrated plasma samples. Mechanisms of natural anticoagulation were measured by verifying the amount of plasma PS and C4BP. Results: R-C4d is related to the recent activity of SLE, since it is correlated with the increased SLEDAI-2K index. In addition to showing the active state, P-C4d may also show a higher risk of thrombotic complications. Increased levels of soluble thrombomodulin and D-dimer were observed in patients with active SLE and both were correlated with the increased SLEDAI-2K index. Conclusion: Patients with an active SLE have a hypercoagulable state related to the endothelial damage. The evaluation of R-C4d is helpful to monitor the early disease activity and PC4-d may be considered as an important tool to detect the increased chances of thrombotic phenomena. The D-dimer marker shows the increased thrombotic potential and soluble

Thrombomodulin may be an important biomarker of endothelial damage contributing to an increased procoagulant risk associated with inflammation.

INTRODUCTION

Among several autoimmune diseases, systemic lupus erythematosus (SLE) is an inflammatory and multisystemic disorder that involves the connective tissue, and may be characterized by circulating antigen-antibody complexes deposited in various tissues. Genetic, environmental and hormonal factors might be directly involved in the etiopathogenesis of SLE leading to the loss of immune balance control (GUERRA, et al., 2011).

For the initial diagnosis of SLE, several clinical criteria are used as suggested by the American College of Rheumatology (ACR). Once the disease is diagnosed, patients should be monitored and the activity status and characterization of SLE should be measured through clinical and laboratory parameters. Therefore, the SLEDAI-2K index is used (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2000) regarding clinical manifestations and results of laboratory tests of patients affected by the disease (GLADMAN, et al, 2000).

According to Ferreira et al 2017, R-C4d levels (reticulocyte-bound C4d) may effectively reflect the current activity of the disease in a certain patient; since the reticulocytes are released into the bloodstream during an active state of the disease may have been immediately exposed to C4-derived fragments produced by the complement activation.

Also related to CB-CAPs and according to a study conducted by NAVRATIL (2006), positive patients to P-C4d (platelet-bound C4d) had a higher frequency of cardiovascular events associated with thrombosis than negative patients to P-C4d. Longitudinal studies analyzed together suggest that patients with SLE with abnormal levels of P-C4d may have a subgroup with an increased thrombotic tendency, cardiovascular risk and cerebrovascular complications. Actually, SLE patients have a significantly increased risk of arterial diseases and venous thrombosis, which is an important cause of morbidity and mortality in this disease. The incidence of myocardial

infarction among SLE patients is 50 times higher when compared to people who do not have the disease (JALLOULI, et al., 2012, PAUDEL, et al., 2016)

Patients with SLE may have defects in natural anticoagulant mechanisms as well as an increased in pro-coagulant factors related to the inflammatory mechanisms and endothelial damage. The natural anticoagulant mechanism is mediated by the integrated action of activated protein C (PCa) and protein S (PS). The action of PCa is maximized with PS as an essential co-factor. Thus, the two proteins act together degrading factors Va and VIIIa, thereby limiting thrombin formation, (VAN 'T, et al., 1997, O'BRIEN, et al., 2000). Acquired PS deficiencies are known to occur due to the presence of anti-PS antibodies or anti-C4b binding protein (C4bBP) (which leads to decreased PS serum levels). Nevertheless, neither the prevalence of anti-PS antibodies nor their clinical significance in association with levels of PS in SLE is known (RUIZ-ARGUELLES, et al., 1991).

Since thrombotic phenomena are frequent in SLE patients and hypercoagulability is directly related to the inflammation and damage to the vascular endothelium, measuring the soluble Thrombomodulin as a marker of vasculitis and D-dimer as an indication of fibrinolysis is interesting (AICÁNTARA, et al., 2013, DHILLOn, et al 2013). D-dimer assays already play a role in the diagnosis of clinical disorders of venous thromboembolism and disseminated intravascular coagulation. Nevertheless, there is a growing literature suggesting that D-dimer may also be an important marker of atherosclerotic diseases (SOOMRO, et al., 2015). Thrombomodulin is a glycoprotein expressed on the luminal surface of vascular endothelial cells, and it is also a key molecule to maintain anticoagulant properties of the vascular endothelium. In diseases linked to endothelial injury, increased soluble Thrombomodulin is observed (MARTIN, et al., 2014).

In this context, the present study is aimed at responding whether high levels of R-C4d and P-C4d, reflecting the activity of SLE, are correlated to the levels of important components for the natural anticoagulation (PS and C4BP) and of markers of coagulation activation (D-dimer) and of endothelial lesion (Thrombomodulin), whether they are correlated to the SLEDAI-2K index.

MATERIALS AND METHODS

Patients

For this study women were selected with age ranging from 18 to 69 years old. According to Yee et., 2011 and based on SLEDAI -2K criteria, 30 patients were classified with inactive disease or a low activity disease ($SLEDAI-2K \leq 4$) and 30 with an active disease ($SLEDAI-2K > 4$) while simultaneously 30 age matched women without SLE or other diseases (controls) were also selected. This study was reviewed and approved by Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil (protocol number CAAE -01928412.8.0000.5149), and written informed consent was obtained from all participants. The research protocol did not interfere with any medical recommendations.

Sixty SLE patients diagnosed according to ACR classification criteria (1997) were sequentially recruited in the Rheumatology Clinic of Hospital Santa Casa, Minas Gerais, Brazil, from February 2013 to April 2016. Patients were assisted by medical staff through which clinical and laboratory data were obtained. Patients with SLE-related diseases, immunosuppressive diseases including HIV / AIDS, autoimmunity, patients who did not authorize and/or did not sign the consent and pregnant women were excluded. All patients were under treatment, alone or in combination. Drugs such as azathioprine, prednisone and hydroxychloroquine were the most used by patients. As control group, twenty women were selected with no autoimmune and/or inflammatory diseases and no family history of SLE. Laboratory evaluation of the control group participants was held using conventional biochemical tests such as glucose, liver enzymes, blood count, urine routine and proteinuria, and all results were normal. Clinical status and exclusion of drugs with the potential to affect the immune system were checked by self-report.

A sample of 5 ml EDTA.K3 of peripheral blood from each fasting eligible participant was collected. Samples were analyzed for R-C4d and P-C4d immediately after venipuncture. Five ml of blood was also collected in sodium citrate tube to obtain plasma.

Flow cytometry technique optimization for R-C4d and P-C4d complement fragments

R-C4d blood levels were determined according to Liu et al., 2005. Briefly, whole blood samples were washed, diluted with physiological saline and aliquoted for staining using murine monoclonal antibody specific for C4d (reactive with fragments containing C4d; Quidel, San Diego, CA) or isotype control MOPC-21, which was added to red blood cells (RBC) suspension at the concentration of 10 µg/mL (50 uL - 1: 100 dilution). Goat anti IgG F (ab ') 2 conjugated to a secondary antibody to murine labeled to phycoerythrin was used at the concentration of 10 µg/ml (2.5 uL). After antibody staining, cell suspensions were incubated with thiazole orange (ReticCount reagent; Becton Dickinson) to identify reticulocytes or with saline (unlabeled control).

The P-C4d blood levels were determined according to Navratil et al., 2006. Whole blood samples collected in EDTA were diluted in PBS and prepared for analysis in the flow cytometer. First, anti-CD42a antibody conjugated with fluorescein isothiocyanate was used to identify the platelet population (BD Biosciences, San Jose, CA). Similarly to what was described for R-C4d, anti-C4d monoclonal antibody (Quidel, San Diego, CA) or the isotype control, MOPC21 was used at the concentration of 10 µg /ml. Finally, anti IgG secondary antibody F (ab ') 2 conjugated to phycoerythrin was added at a concentration of 10 µg/ml. Stained cells were analyzed using flow cytometry (BD Fortessa, U.S.A.).

Data acquisition and analysis in flow cytometer

Flow cytometer used in this study was equipped with argon lamp that allows the evaluation of at least 10 parameters. The target cell populations were identified and their percentage was determined by using BD FACSDiva Software™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) coupled to a cytometer. To evaluate the levels of P-C4d, platelets were identified by their "forward and side scatter" properties (FIGURE 1Bi) and CD42a expression as a specific platelet marker (FIGURE 1Bii). C4d-specific fluorescence bound to the platelets was determined by subtracting the mean fluorescence intensity (MFI) of isotype control MOPC21 from the MFI of platelets stained with anti-C4d (FIGURE 1Biii).

Analysis of the cell population was performed using Flow Jo (FlowJo Enterprise). For the analysis of R-C4d levels, erythrocytes were identified based on their "forward and

side-scatter" (Size x Granularity) properties (FIGURE 1Ai), while reticulocytes were identified based on their forward-scatter properties and positive staining with thiazole orange (size x color) (FIGURE 1Aii). From the previous chart, histograms were performed to analyze the expression intensity of C4d on reticulocytes surface (FIGURE 1Aiii). Values were calculated by reducing the R-C4d expression by value of the isotype control expression.

Determination of plasma levels of Thrombomodulin (TM)

The quantitative determination of Thrombomodulin (TM) in citrate plasma samples was carried out with the IMUNOBIND[®] Thrombomodulin ELISA diagnostic set (American Diagnostica Inc. - Stanford, CT), following the manufacturer's instructions contained in the kit.

The sandwich ELISA IMUBIND ELISA test was carried out to determine the TM, using a monoclonal antibody that recognizes EGF1 - EGF2 domains of TM. Samples were incubated in microwells precoated with the capture antibody. A second reagent (HRP) conjugated to monoclonal antibody specific to EGF5 - EGF6 domains was used since this one recognizes the Thrombomodulin-bound. The addition of tetramethylbenzidine (TMB) perborate substrate and its subsequent reaction to HRP resulted in a blue solution. The sensitivity was increased by adding a sulfuric acid stop solution, transforming the blue color solution into a yellow solution. Levels of TM were determined by measuring the absorbance at 450 nm of the solution and by comparing values with those of the standard curve.

Determination of plasma levels of D-dimer (DDi)

The quantitative determination of DDi in citrated plasma samples was carried out with the IMUNOCLONE[®] D-DIMER ELISA diagnostic set (American Diagnostica Inc. - Stanford, CT), following the manufacturer's instructions contained in the kit. This method uses a monoclonal antibody against human DDi attached to the surface of the test's plate wells. During the incubation period, DDi of the sample under analysis binds to the well surface covered with antibodies. After a stage in which proteins foreign to the reaction are removed for washing, a monoclonal antibody is added conjugated to

peroxidase (HRP), which recognizes bound DDi and completes the formation of sandwich antibody complex. After another washing step, a substrate is added to the plate wells and the HRP reaction forms a blue solution. The enzyme-substrate reaction is interrupted by adding sulfuric acid, which changes the color of the solution to yellow. The level of DDi is quantified by measuring the absorbance of the solution at 450nm and comparing values to those of the standard curve. This curve was built from dilutions of the calibrator plasma with a known concentration, strictly following the manufacturer's instructions.

Determination of plasma levels of total Protein S (PS) and C4b-binding protein (C4BP)

The ELISA method was used to determine PS through the Asserachrom® PS:Ag diagnostic kit (Diagnostica Stago®, Asnière, France). The procedure consists of incubating the patient's plasma with anti-PS antibodies stained with peroxidase. This enzyme is responsible for breaking the substrate TMB with posterior quantification in spectrophotometer at absorbance of 450 nm. Results were expressed in percentage with a reference value between 70% and 130%. Plasma levels of C4BP were measured through the immunological method using latex (LIATEST C4BP; Diagnostica Stago). For the preparation of calibrators, a pool of 15 plasmas from health women was used. After preparing the procedure described in the instructions, the absorbance of the samples was measured in 540 nm.

Statistical analysis

Data analysis was performed using GraphPad Prism software 6TM. Kolmogorov-Smirnov test was performed to assess the normality of variables. In case of non-normally distributed data, Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used. In all cases, significance was considered at $p < 0.05$. Additionally, Minitab version 17 was used to perform histograms of R-C4d and P-C4d. The software was also used to prepare the scatterplot showing the definition of the limits of frequency for both markers. Correlation tests were also carried out among R-C4d, P-C4d, DDi and TM expressions versus SLEDAI -2K index using Spearman test.

RESULTS

Characteristics of the study participants.

The study population consisted of 60 women with SLE and 30 healthy controls. At the time of entry into the study, mean \pm SD age of the SLE patients was 43.2 ± 12.18 years (range 18–69 years), while mean \pm SD age of the healthy control subjects was 44.7 ± 12.9 years. The study included patients with new-onset as well as longstanding disease, showing a broad range of disease activity, as reflected in the SLEDAI-2K score, and had a wide spectrum of organ involvement. It is worth noting that the use of corticosteroids may interfere with the FAN positivity, a fact that may have been observed in our study population (positive FAN in 72.3% of the patients). Additional demographic and clinical features of the SLE patients are shown in Table 1.

R-C4d and P-C4d expression in SLE patients with active, inactive/low activity disease, and healthy controls. Correlation with SLEDAI-2K index

A standardized protocol described in the methodology was carried out through flow cytometry and the evaluation of the expression of C4d marker bound to reticulocytes and platelets (FIGURE 2).

Regarding the R-C4d, significant differences were found while comparing the following groups: SLE-A (SLEDAI-2K higher than 4), SLE-I (SLEDAI 2K less than or equal to 4) and NC (negative control, i.e., individuals without the disease) ($p < 0.0001$; Kruskal-Wallis) (FIGURE 2 A). The group with SLE-A was shown to have higher values of frequency for RC4d when compared to SLE-I and NC groups (median of 22.45×3.045 , respectively) and NC (median of 22.45×1.15 respectively). After applying the Mann-Whitney's statistical test, a difference was seen between NC and SLE-A groups ($p < 0.0001$), and between SLE-A and SLE-I groups ($p < 0.0001$).

As for the P-C4d marker, patients with SLE-I and NI individuals had very low levels of frequency. Significant differences were found when compared to SLE-A, SLE-I and NC groups ($p < 0.0001$; Kruskal-Wallis) (FIGURE 2B). The highest values of P-C4d frequency was seen in the SLE-A group. Significant differences between NC and SLE-

A groups ($p < 0.0001$), and between SLE-A and SLE-I groups (FIGURE 2B) were also observed.

In order to evaluate whether the increase in the frequency of the expression of RC4d and PC4d markers follow the increased severity of the disease, correlation analyses were carried out between the frequency of the expression of R-C4d, P-C4d and the SLEDAI-2K index ($r = 0,759$ and $r = 0,822$ respectively). A positive correlation was seen between frequencies of R-C4d, P-C4d and the increased SLEDAI-2K index (FIGURE 2C and 2D).

Evaluation of serum levels of markers of hypercoagulability (D-dimer), of the endothelial lesion (Thrombomodulin) and correlation of these with the SLEDAI-2K index.

Significant differences were found when comparing the following groups: SLE-A, SLE-I and NC ($p < 0.0001$; Kruskal-Wallis), for both markers (FIGURE 3A and 3B). The group with SLE-A was observed to have a higher serum value for DDi and TM when compared to the groups with SLE-I and NC (DDi median of 29,76 x 18,6) and NC (median of 29,76 x 7,47) (TM median of 0,33 x 0,249) and NC (median of 0,33 x 0,20). After applying the Mann-Whitney statistical test, a difference was verified between CN and LES-A groups and between SLE-A and SLE-I groups (for both markers).

Analyses of the correlation among serum levels of DDi ($r = 0,21$), TM ($r = 0,332$) and the SLEDAI-2K index were conducted. A positive correlation was shown of markers with the SLEDAI-2K index (FIGURE 3C and 3D). Therefore, in the present study, it was shown that the greater the severity of the disease, the greater the hypercoagulable potential translated into high plasma levels of DDi and TM, the latter a marker of endothelial lesion, that, ultimately, favors the pro-thrombotic state.

Evaluation of serum levels of markers of natural anticoagulation PS and C4BP in SLE patients and healthy individuals.

In order to evaluate possible deficiencies of the natural anticoagulant mechanisms, plasma levels of protein S and the C4BP binding protein markers were measured in SLE

patients and in health individuals. When compared to SLE-A, SLE-I and NC levels (FIGURE 4A and 4B) no significant differences were seen. After applying the Mann-Whitney statistical test, no difference was verified between NC and SLE-A groups (for both markers), and between SLE-A and SLE-I (for both markers) (FIGURE 4A and 4B).

Definition of a cut-off point to evaluate the SLE activity through the expression of R-C4d and P-C4d.

For the classification of the activity of the disease, a probable cut-off point was established together for the R-C4d and P-C4d markers. The definition of the cut-off point was possible because both markers have a strong association with the SLE activity. It was observed that 95% of SLE-I patients have values lower than 20 % of expression for R-C4d and 40% for P-C4d (FIGURE 5 C). It was also verified that 94.7% of patients from the group with SLE-A have values of R-C4d expression higher than 20% and values of P-C4d expression higher than 40% (FIGURE 5 C). Therefore, values of the frequency of R-C4d expression were lower than 20% (FIGURE 5 A) and the value of frequency of P-C4d expression lower than 40% (FIGURE 5 B) may, together, establish a parameter to indicate a low activity/inactivity of the disease.

Since the P-C4d is associated with a greater tendency to cardiovascular events in SLE patients (according to data already described in the literature and mentioned in this article), may suggest values under 40% for the expression of P-C4d may lower thrombotic risk.

Discussion

An important aspect to be considered is the fact that in SLE, inflammatory phenomena are closely associated with a pro-thrombotic state, since inflammatory mechanisms contribute to an increase in procoagulant factors, reduction of natural anticoagulants and inhibition of the fibrinolytic activity (ESMON, 2003). In this context, the importance of the relation among inflammatory aspects is seen related to the SLE activity and hemostatic factors, based on the fact that thrombotic phenomena are important events that increase morbidity and mortality associated with the disease (CHEN & DORLING, 2009).

Related to the identification of active states (flares) in SLE patients, the R-C4d marker stands out. Considering the fast reticulocyte exposure to proteolytic fragments of the complement system and its fugacity in the circulation, determining the frequency of R-C4d, whose results reflect the status of the disease at a certain moment in a certain patient may be a very promising tool for the therapeutic monitoring adopted, signaling possible relapses (flares). This statement is based on the fact that R-C4d levels were correlated to the clinical activity of SLE according to the index used to assess the disease, SLEDAI-2K. It was verified that the higher the SLEDAI index, that is, the greater clinical severity, the higher the frequencies of R-C4d (FIGURA 2C) observed, which would be reflecting a very recent activity of the disease. Patients with the active disease were seen to have a high R-C4d, in contrast to the levels observed in patients with the inactive disease and healthy individuals (FIGURE 2A). Therefore, levels of R-C4d are shown to be effectively related to the recent activity of SLE. For the P-C4d and according to data already described in the literature (NAVRATIL, et al.,206), increased levels of C4d bound to platelets, are related to the hypercoagulated state in SLE patients. In our study, a high expression of P-C4d in patients with the active disease (FIGURE 2B) and an increase in the frequency of the expression of the marker followed the severity of the disease, since a positive correlation was found with the SLEDAI-2K index (FIGURE 2C). According to the results obtained, it may be suggested that R-C4d and P-C4d markers together, would play a role of monitoring or even predicting the activity of SLE, as well as directing clinical procedures for the care of a possible pre-thrombotic state.

Considering SLE as an essentially inflammatory disease and the relationship between inflammation and hemostasis, it may be suggested that the greater the hypercoagulable state the greater the inflammatory process and vice versa. This reciprocity of effects produced by hemostatic and inflammatory changes would favor the risk of thrombotic complications, which, at first, would aggravate the disease. In the present study, patients with the active disease were seen to have higher levels of markers related to hypercoagulability, such as DDi and TM (FIGURE 3A and B). It was also observed that the greater the inflammatory nature, the greater the levels of markers of the pro-thrombotic state. This statement may be supported based on plasma levels of DDi and

TM markers, which were directly correlated to the SLEDAI-2K index (FIGURE 3C and D).

Since SLE is an essentially inflammatory disease and the inflammation is related to the endothelial damage, the hypercoagulable state in active SLE is suggested to be related to the inflammatory mechanism with the consequent lesion of the vascular endothelium. One way of evaluating the vascular integrity is by determining the plasmatic TM, since it is essentially a membrane protein. Thus, increased plasma levels of TM may indicate laboratory evidence of endothelial lesion and indirectly, reduction of the effectiveness of the anticoagulation system via protein C and protein S (SOARES, et al., 2010). This fact allows to suggest that the hypercoagulable mechanism is closely related to endothelial inflammation and lesion to the detriment of the autoimmune component, related to the presence of anti-PS antibodies, once levels of PS and C4BP were very similar among patients with active and SLE, and also healthy individuals (FIGURE 4A and B).

Since R-C4d is related to the recent activity of SLE and of P-C4d in addition to showing an active state may also show a higher risk of thrombotic complications, analyses were performed together in order to detect a cutoff value for the stratification of patients with the active disease, with a higher thrombotic risk. In our analysis, values greater than 20% for R-C4d have been shown to be related to the recent activity of SLE, and values greater than 40% for P-C4d may show an active disease with thrombotic risk. Together, markers are related to the active disease, since only one patient with SLE-A was out of these parameters (95% of SLE patients-A have values greater than 20% for R-C4d and 40% for P-C4d) (FIGURE 5 A, B and C).

Conclusion

From the data obtained in this study, patients with an active SLE are suggested to have a hypercoagulable state related to the endothelial damage and stimulation of coagulation through inflammation. The assessment of complement activation products (C4) bound to reticulocytes is useful to monitor early disease activity and PC4-d may be considered an important tool to help the clinical detection as for the increased chances of developing thrombotic phenomena in a certain patient.

Acknowledgments

To the Rheumatology Service of Hospital Santa Casa from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, for their valuable collaboration in patient recruitment. To the patients for participating in this study and CNPq, CAPES and FAPEMIG for funding it.

Conflict of interest: The authors of this study declare having no conflicts of interest.

References

1-Chen D & Dorling A, 2009. Critical roles for thrombin in acute and chronic inflammation. **J Thromb Haemost.** 2009.

2- Dhillon PK, Adams MJ. Thrombosis in systemic lupus erythematosus: role of impaired fibrinolysis. **Semin Thromb Hemost.** 2013 Jun;39(4):434-40

3-Esmon, CT, et al. Inflammation and thrombosis. **J.Thromb. Haemost.**, 1:1343-1348, 2003.

4-Gladman DD, et al. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. **J Rheumatol.** 2002 Feb;29(2):288-91.

5-Ferreira KS, Loures CDMG, Campos FMF et al. Levels of circulating reticulocytes-C4d: is there link to disease activity in patients with SLE? *Int J Health Sci Res.* 2017; 7(1):130-137.

6-Guerra CCC, et al. **Clínica e Laboratório, Lúpus Eritematoso Sistêmico**, São Paulo: Sarvier, 2011, p. 210-213.

7-Jallouli M, et al. **Clinical implications and prognostic significance of thrombocytopenia in Tunisian patients with systemic lupus erythematosus.** *Lupus* 2012;21:682–7.

8- Liu CC, et al. Cell-bound complement biomarkers for systemic lupus erythematosus: from benchtop to bedside. **Rheum Dis Clin North Am.** 2011 Feb;36(1):161-72, x.

9- Liu CC, et al. Lymphocyte-bound complement activation products as biomarkers for diagnosis of systemic lupus erythematosus. **Clin Transl Sci.** 2009 Aug;2(4):300-8.

10- Liu CC, et al. Reticulocytes bearing C4d as biomarkers of disease activity for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.** 2005 Oct;52(10):3087-99.

11-Manzi S, et al. Measurement of erythrocyte C4d and complement receptor 1 in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.** 2004 Nov;50(11):3596-604.

12-Martin FA, et al. Regulation of thrombomodulin expression and release in human aortic endothelial cells by cyclic strain. **PLoS One.** 2014 Sep 19;9(9):e108254.

13- Navratil JS, et al. Platelet C4d is highly specific for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006 Feb;54(2):670-4. Erratum in: **Arthritis Rheum.** 2006 Jun;54(6):2009. PubMed

14-O'Brien LM, et al. Regulation of factor VIIIa by human activated protein C and protein S: inactivation of cofactor in the intrinsic factor Xase. **Blood.** 2000 Mar 1;95(5):1714-20.

15-Paudel KR, et al. **Circulating Endothelial Microparticles: A Key Hallmark of Atherosclerosis Progression.** Scientifica (Cairo). 2016

16-Ruiz-Arguelles GJ, et al. Natural anticoagulants in systemic lupus erythematosus: deficiency of protein S bound to C4b-bp associated with recent history of venous

thrombosis, antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome. **J Rheumatol.** 1991.

17-Soares, AL, et al . Avaliação da anticoagulação natural em pacientes com diabetes mellitus tipo 2.**J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro , v. 42, n. 2, p. 67-75, Apr. 2010 .

18-Soomro AY, et al. The current role and future prospects of D-dimer biomarker. **Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother.** 2016 Jul;2(3):175-84.

19-van 't Veer C, et al. Inhibitory mechanism of the protein C pathway on tissue factor-induced thrombin generation. Synergistic effect in combination with tissue factor pathway inhibitor. **J Biol Chem.** 1997 Mar 21;272(12):7983-94.

20-Zaldívar-Alcántara H, et al. [Risk factors for the development of thrombotic complication in patients with lupus erythematosus and lupus nephropatic]. **Rev Invest Clin.** 2013 May-Jun;65(3):199-208.

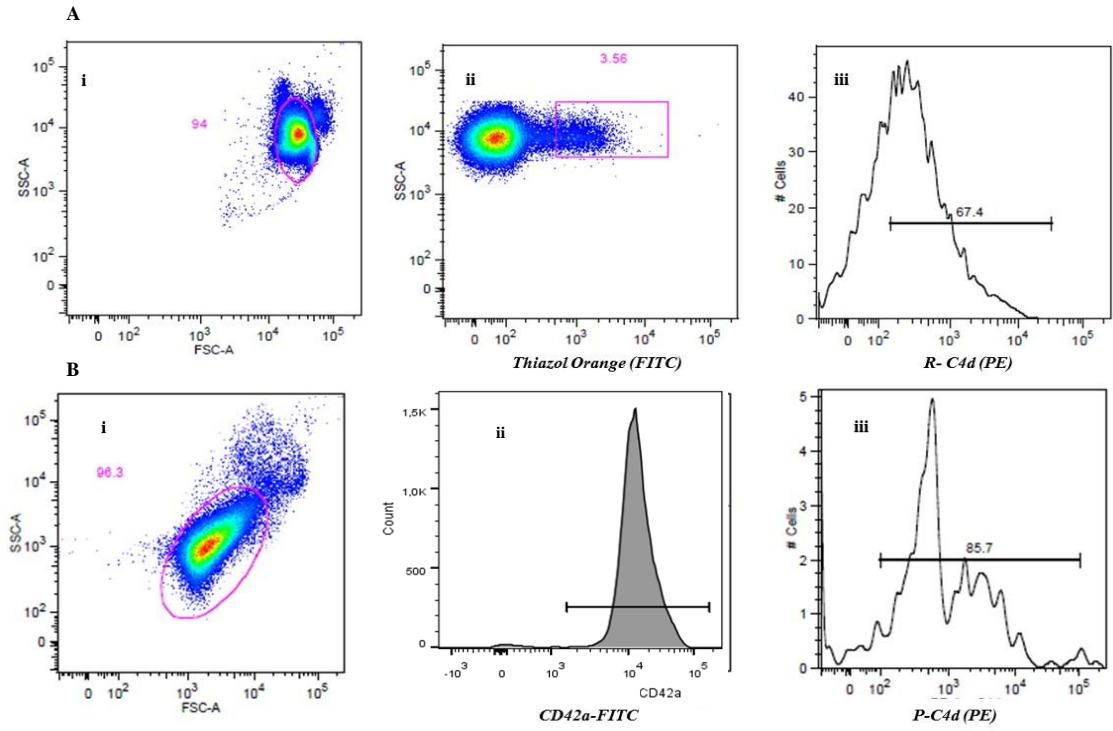


Figure 1. Analysis for R-C4d and P-C4d by flow cytometry. Labelling for R-C4d (Ai, ii and iii). Ai shows erythrocytes and Aii the population of reticulocytes stained by Thiazole Orange. Aiii shows the median fluorescence intensity in a histogram to measure R-C4d expression. Labelling for P-C4d (Bi, ii and iii). Bi shows platelets and Bii the population of platelets stained by CD42aFITC. Biii shows the median fluorescence intensity in a histogram to measure P-C4d expression.

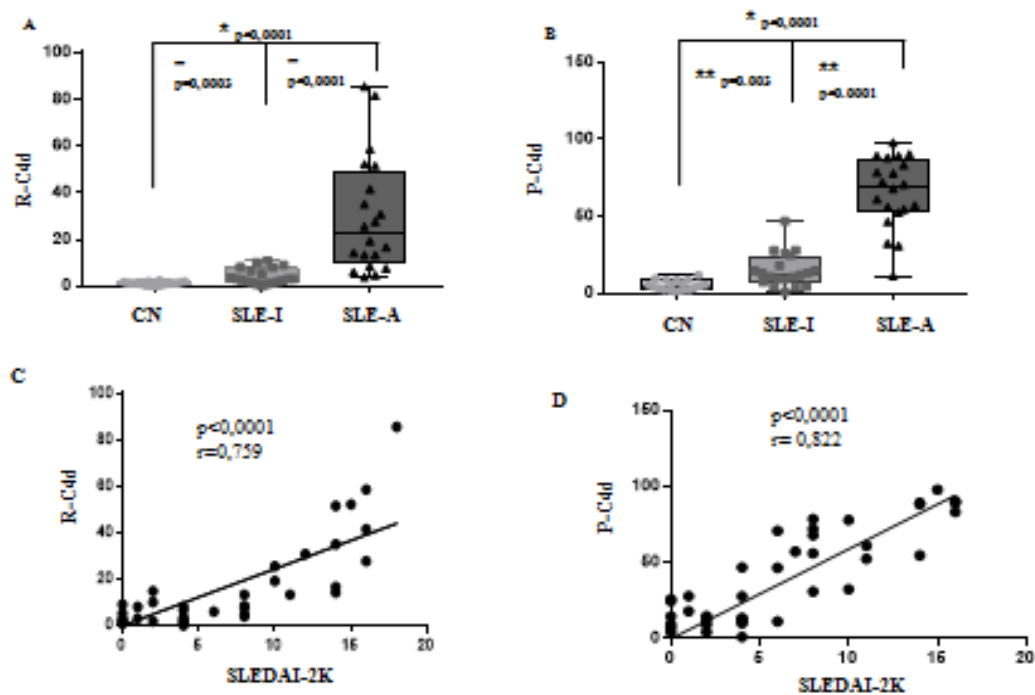


Figure 2. RC4d and PC4d expression and correlation with SLEDAI-2K and R-C4d, PC4d expression in controls (NC), in patients with inactive or active SLE. Expression of RC4d (in percentage) in controls and in patients with inactive (SLE-I) or active (SLE-A) disease (A). Expression of PC4d (in percentage) in controls and in patients with inactive (LES-I) or active (SLE-A) disease (B). Spearman correlation of R-C4d and P-C4d expression by flow cytometry versus SLEDAI 2K values (C, D). P values < 0.05 were considered significant. Kruskal-Wallis (*) and Mann-Whitney (**).

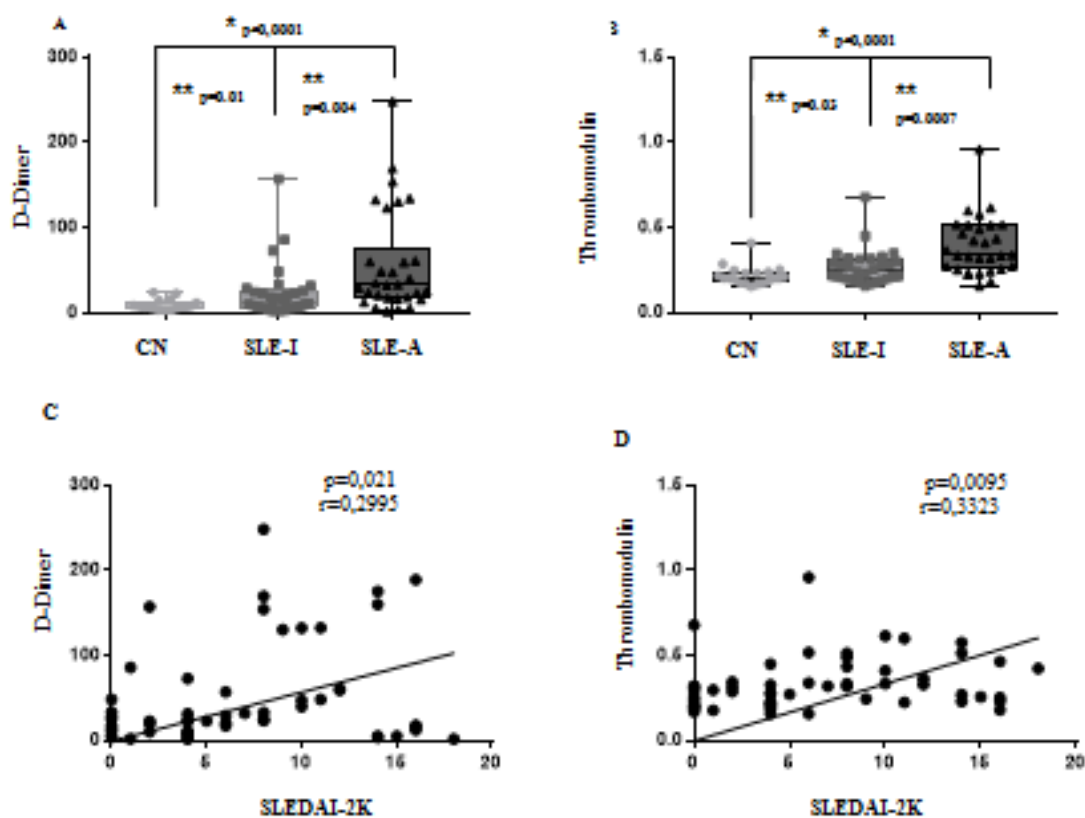


Figure 3. D-dimer and thrombomodulin levels and correlation with SLEDAI-2K and D-dimer, Thrombomodulin levels in controls (NC), in patients with inactive or active SLE. Levels of D-dimer (in percentage) in controls and in patients with inactive (SLE-I) or active (SLE-A) disease (A). Levels of Thrombomodulin (in percentage) in controls and in patients with inactive (SLE-I) or active (SLE-A) disease (B). Spearman correlation of D-dimer and Thrombomodulin levels versus SLEDAI 2K values (C, D). P values < 0.05 were considered significant. Kruskal-Wallis (*) and Mann-Whitney (**).

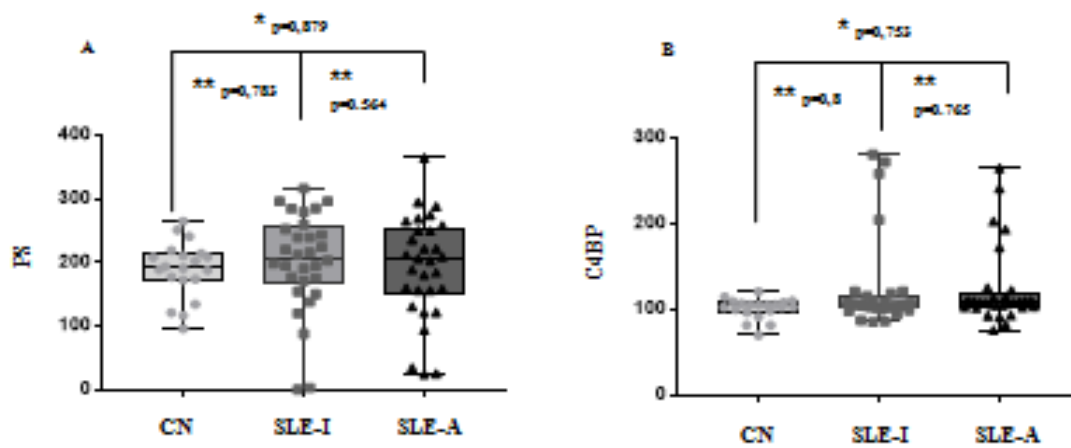


Figure 4. Protein S and C4BP levels in controls (NC), in patients with inactive or active SLE. Levels of Protein S (in percentage) in controls and in patients with inactive (SLE-I) or active (SLE-A) disease (A). Levels of C4BP (in percentage) in controls and in patients with inactive (SLE-I) or active (SLE-A) disease (B) (p values <0.05 were considered significant. Kruskal-Wallis (*) and Mann-Whitney (**).

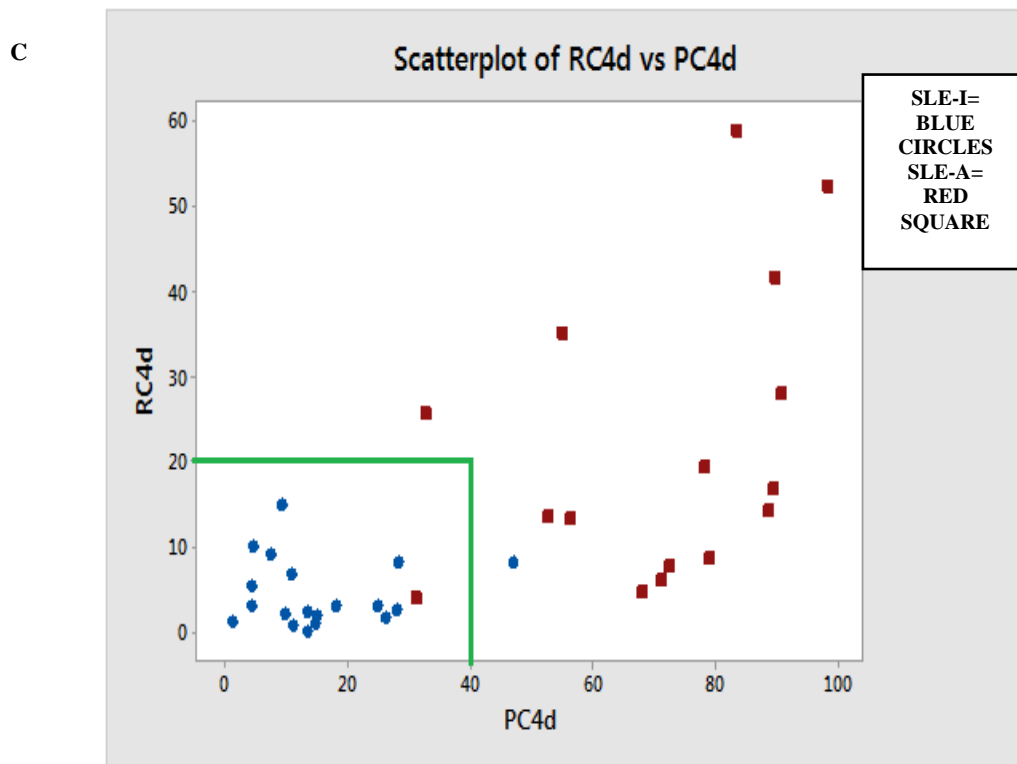
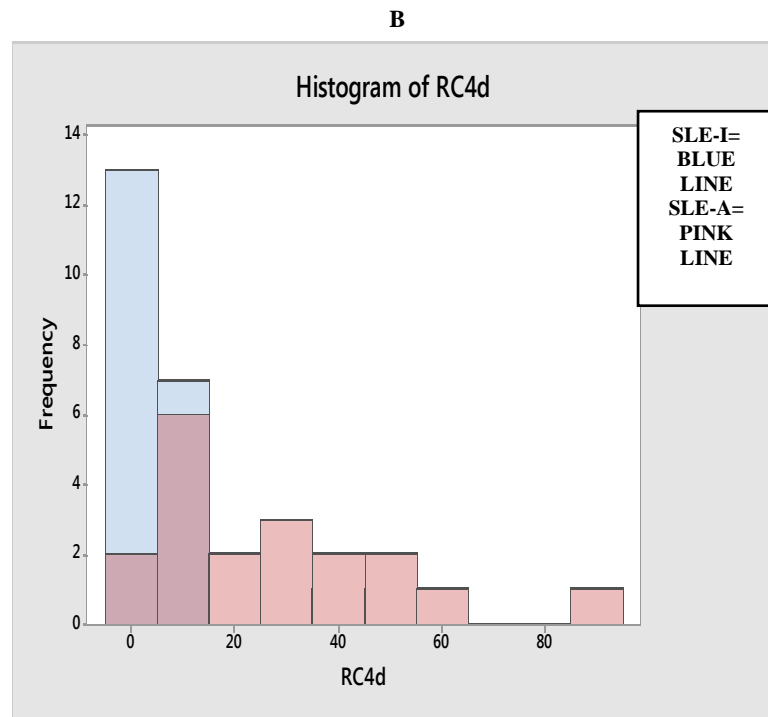
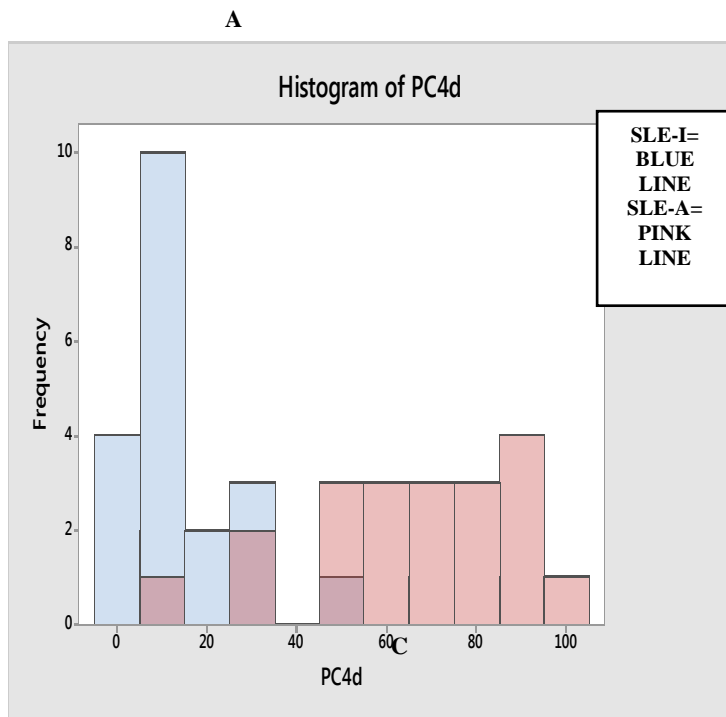


Figure 5. Association between the expression of R-C4d and P-C4d and measurement of a cut-off point for delineation of SLE activity. In A the cutoff point for P-C4d is shown. In B the cutoff point for R-C4d is shown. Figure C shows the association between both points 40% for P-C4d and 20% for R-C4d.

Table 1. Clinical characteristics of the patients with SLE

Characteristics	N= 60 results (%)
age, mean +/- sd (range) years	43 +/- 12.18 (18-69)
Clinical manifestations, % positive since SLE diagnosis	
Antinuclear antibodies (fan)	72,3
Arthritis	35,7
Photosensitivity	35,0
Hematologic manifestations	43,0
leukopenia	8,1
Thrombocytopenia	12,3
anemia	10,1
Proteinuria	39,3
Low complement C4	37
Low complement C3	30
Malar rash	29,1
(anti-dna/anti-sm)	18,5
Mucosal ulcers	21,8
Psychosis	9,0
Pleurisy/Pericarditis	6,0
Discoid rash	7,6

7.0-CONSIDERAÇÕES FINAIS, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O LES é uma doença de etiologia multifatorial que promove mudanças profundas nos mais diversos aspectos da resposta imunológica e inflamatória. Os mecanismos envolvidos no processo de início e períodos de atividade do LES são ainda pouco compreendidos. Vários métodos laboratoriais e parâmetros clínicos são utilizados atualmente para tentar estabelecer uma conduta ideal para o correto diagnóstico e o acompanhamento adequado dessa doença. O estudo de novos biomarcadores é de suma importância para permitir uma abordagem mais direcionada aos pacientes portadores dessa complexa doença de manifestações tão heterogêneas. Nesse contexto, destaca-se a importância de estudos como o atual, o qual relacionou novos biomarcadores aos fenômenos inflamatórios exacerbados durante os períodos de atividade do LES aos possíveis mecanismos predisponentes ao risco pró-trombótico. Portanto, otimizar e validar técnicas que possam detectar doença em atividade de maneira precoce (R-C4d) ou, ainda, detectar atividade da doença relacionada ao maior risco de complicações cardiovasculares e trombóticas em geral (P-C4d) pode ser bastante promissor, uma vez que tais biomarcadores poderão ser utilizados na prática clínica. Em outras palavras, estudos adicionais envolvendo uma amostragem maior, em outras partes do nosso país e do mundo, poderão contribuir para reforçar nossos dados no que se refere à definição da utilidade clínica e custo-efetividade dos biomarcadores R-C4d e P-C4d.

Ressalta-se que o teste de R-C4d pode ser importante para diagnosticar precocemente doença em atividade e P-C4d para diagnosticar não apenas atividade desta doença como também tendência trombótica, além de utilidade destes testes para monitoramento da doença e sucesso ou falha ao tratamento convencional e outros mais recentes. Ainda seriam importantes para discriminar aqueles que poderiam se beneficiar da continuidade do tratamento. Todavia, o teste negativo poderá ser uma ferramenta auxiliar importante para descartar diagnósticos errôneos ou talvez para discriminar entre LES em atividade ou associado à infecção ou, ainda, poderá ser útil em situações específicas. Sabendo-se da importância clínica do diagnóstico diferencial entre LES em atividade e processos infecciosos ou mesmo concomitância dos dois processos, estudos nesse sentido são essenciais e merecem ser desenvolvidos. Espera-se que as ferramentas laboratoriais implementadas e validadas no presente estudo possam ser aplicadas em novos projetos

que possam ampliar o nível de conhecimento atual acerca desta complexa doença. Especificamente, espera-se que tais ferramentas possam servir como uma nova classe de biomarcadores personalizados para diagnóstico e monitoração da atividade da doença, avaliação e predição das características clínicas e estratificação de subtipos de LES, talvez com maior sensibilidade e especificidade do que o índice SLEDAI-2K.

No que se refere aos outros marcadores avaliados para se investigar o potencial hipercoagulável em pacientes com LES, pode-se afirmar que um maior estado de hipercoagulabilidade foi observado naqueles com doença em atividade com base nos níveis elevados de DDi, indicando ativação da coagulação, além de níveis também elevados de TM, um marcador de lesão endotelial. Quanto maior a atividade da doença, maior o estado de hipercoagulabilidade. No entanto, o estado de hipercoagulabilidade detectado nas pacientes com doença em atividade não parece ser influenciado por componentes da anticoagulação natural tais como proteína S e proteína ligadora de C4 (C4BP), os quais se mostraram similares entre os pacientes com LES em atividade ou não. Portanto, sugere-se que os mecanismos autoimune e inflamatório ocorrendo no LES não sejam decisivos no comprometimento de tais componentes.

Ao lado de alguns avanços deste estudo, cumpre ressaltar também algumas limitações do mesmo. Não foi possível obter dados sobre anticorpos antifosfolípidos (anticoagulante lúpico e anticorpos anti-cardiolipina), o que seria interessante devido à relação destes anticorpos com fenômenos trombóticos. Também não foi possível coletar amostra de sangue de pacientes que já haviam sofrido evento trombótico, uma vez que estes estavam em uso de anticoagulante oral (critério de exclusão). Dessa forma, não foi possível correlacionar níveis dos novos biomarcadores, ou mesmo de DDi, com o desfecho clínico. Subgrupos com proteinúria ou nefrite lúpica, também não foram explorados por causa do n bastante limitado. Também não foram explorados os esquemas terapêuticos adotados por cada paciente (azatioprina, prednisona e hidroxicloroquina foram os mais utilizados), em virtude da mesma razão anterior. Um modelo de regressão logística no qual se investigaria as variáveis determinantes de doença em atividade, também não pode ser realizado em função do n limitado, fato agravado pela ausência de muitos dados essenciais nos prontuários médicos. Outras doenças autoimunes, tais como artrite reumatoide e outras similares também não foram

incluídas, fato que dificulta uma conclusão sobre a especificidade de R-C4d e P-dC4d no LES. Finalmente, com referência à nossa hipótese de estudo, pode-se afirmar que os níveis de CB-CAPs (R-C4D e P-C4d) em pacientes com LES podem ser preditores de atividade da doença (R-C4d) e de predisposição trombótica (P-C4d), este último reforçado por meio de biomarcadores de ativação da coagulação. Dessa forma, nos períodos de atividade da doença, cuidados especiais devem ser dispensados aos pacientes particularmente no que se refere à predisposição trombótica.

Conclusões:

- Os resultados obtidos por ambos os biomarcadores R-C4d e P-C4d mostraram uma alta correlação com o índice SLEDAI-2K. Em outras palavras, níveis elevados de R-C4d e P-C4d correlacionaram com piora clínica em pacientes com LES;
- A combinação de R-C4d e P-C4d permitiu o estabelecimento de uma proposta de *cutoff* como indicativo de doença em atividade;
- Os dados confirmaram a relação entre doença em atividade e estado de hipercoagulabilidade, provavelmente associado à dano endotelial e inflamação;
- Níveis elevados de R-C4d e P-C4d foram mais sensíveis para discriminar doença em atividade quando comparados ao C4;
- O estado de hipercoagulabilidade detectado nos pacientes com doença em atividade não parece ser influenciado por componentes da anticoagulação natural tais como proteína S e proteína ligadora de C4 (C4BP).
- Finalmente, os dados em conjunto reforçam o elo entre os estados inflamatório e prócoagulante.

8.0- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam SS, et al. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. **Blood**, 113(13):2878–2887, 2009.

Adinolfi A, Valentini E, Calabresi E, et al. One year in review 2016: systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol**. 2016 Jul-Aug;34(4):569-74. Review.

Agno, W, et al. The negative predictive value of D-dimer on the risk of recurrent venous thromboembolism in patients with multiple previous events: a prospective cohort study (the PROLONG PLUS study). **Am J Hematol**, 87(7):713-5, 2012b.

Alarco'n-Segovia D, Deleze M, Oria CV, et al. Antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome in systemic lupus erythematosus. **Medicine** (Baltimore) .1989.

Alunno A. et al. Balance between Regulatory T and Th17 Cells in Systemic Lupus Erythematosus: The Old and the New. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012. ISSN 1740-2522.

Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. **N Engl J Med**. 2003.

Baecher-allan C, Brown J.A, Freeman G.J, et al. CD4+CD25+high regulatory cells in human peripheral blood. **J. Immunol**. 167:1245-1253, 2001.

Barilla-LaBarca, M. Kathryn L, John D. Lambris, Dennis Hourcade and John P. Atkinson. Role of Membrane Cofactor Protein (CD46) in Regulation of C4b and C3b Deposited on Cells. **J. Immunol** June 15, 2002, 168 (12) 6298-6304.

Bates, S. M. D-Dimer Assays in Diagnosis and Management of Thrombotic and Bleeding Disorders. **Semin Thromb Hemost**, 38(7):673-82, 2012

Bonelli M., Savitskaya A.; Von, D.K. et al. Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Int Immunol**, v. 20, n. 7, p. 861-8, 2008. ISSN 0953-8178

Borchers AT, Naguwa SM, Shoenfeld Y, et al. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. **Autoimmun Rev**. 2010 Mar;9(5):A277-87.

Blom AM. Structural and functional studies of complement inhibitor C4b-binding protein. **Biochem Soc Trans**. 2002 Nov;30(Pt 6):978-82.

Crispin JC, TSokos, GC. Human TCR- $\alpha\beta$ + CD4- CD8- T Cells Can Derive from CD8+ T Cells and Display an Inflammatory Effector Phenotype1. **J Immunol**, v. 183, n. 7, p. 4675-81, 2009. ISSN 0022-1767 (Print)1550-6606 (Electronic).

Cosmi, B. et al. PROLONG Investigators (on behalf of FCSA, Italian Federation of Anticoagulation Clinics). Residual venous obstruction, alone and in combination with D-dimer, as a risk factor for recurrence after anticoagulation withdrawal following a first idiopathic deep vein thrombosis in the prolong study. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, 39(3):356-65, 2010.

Cosmi, B. et al. D-dimer and residual vein obstruction as risk factors for recurrence during and after anticoagulation withdrawal in patients with a first episode of provoked deep-vein thrombosis. **Thromb Haemost**, 105(5):837-45, 2011.

Cosmi B, Palareti, G. D-dimer, oral anticoagulation, and venous thromboembolism recurrence. **Semin Vasc Med**, 5(4):365-70, 2005.

Davie EW , Ratnoff, O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, p. 1310-1312, 1964 apud

Dahlbäck B. Protein S and C4b-Binding Protein: componentes involved in regulation of the protein C anticoagulant system. **Thromb. Haemost.** 1991; 66(1): 49-61.

-Esmon CT. Inflammation and thrombosis. **J.Thromb. Haemost.**, 1:1343-1348, 2003.

Falk R H. Atrial Fibrillation. **N Engl J Med**, 344(14):1067-78, 2001.

Fang, WT, et al. The role of statin therapy in the prevention of atrial fibrillation: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Br J Clin Pharmacol**, 74(5):744-56, 2012.

Ferreira CN, Sousa MO, Dusse LMS, et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 2010; 32(5): 416-421.

Fiona AM, Ronan PM, Philip MC. Thrombomodulin and the vascular endothelium: insights into functional, regulatory, and therapeutic aspects. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 304: H1585–H1597, 2013.

Franco, R.F. Overview of coagulation, anticoagulation and fibrinolysis. **Medicina, Ribeirão Preto**, 34:229-237, 2001.

Freire EAM, Souto LM, Ciconelli RM. Medidas de Avaliação em Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Revista Brasileira Reumatol** 2011;51(1):70-80.

Green, D. Coagulation cascade. **Hemodialysis International**, 10:s2-s4, 2006.

Gladman DD, Ibañez D, Urowitz MB. **Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000**. *J. Rheumatol.*, v. 29(2), p. 288-291, 2002.

Hackeng TM, Sere´ KM, Tans G, et al. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. **Proc Natl Acad Sci USA** 2006.

Hackeng TM and Rosing J. Protein S as cofactor for TFPI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Dec;29(12):2015-20. Review.

Hepburn AL, Narat S, Mason JC. The management of peripheral blood cytopenias in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology** (Oxford) 2010;49:2243.

Henri H. Versteeg, Johan W. M. Heemskerk, Marcel Levi, and Peter H. Heitsma. New fundamentals in Hemostasis. **Physiol. Rev.** 93:327-358,2013.

Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum.** 1997 Sep;40(9):1725..

Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. **J thromb thrombolysis.** 2003b; 16 (1/2): 17-20.

Hoffman, M., Monroe, D. M. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*, 85:958–65, 2001 apud HOFFMAN, M. A cell-base model of coagulation and the role of factor VIIa. **Blood Reviews**, 17:s1-s5, 2003.

Hoffman, M.; Monroe, D. M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematol Oncol Clin North Am*, 21(1):1-11, 2007.

Jakes RW. Systematic review of the epidemiology of systemic lupus erythematosus in the Asia-Pacific region: prevalence, incidence, clinical features, and mortality. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 64, n. 2, p. 159-68, 2012. ISSN 2151-464x.

Jallouli M, Frigui M, Marzouk S, et al. Clinical implications and prognostic significance of thrombocytopenia in Tunisian patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus** 2012;21:682–7.

Leffler J, Bengtsson AA, Blom AM. The complement system in systemic lupus erythematosus: an update. **Ann Rheum Dis.** 2014 Sep;73(9):1601-6.

Liszewski MK, Kolev M, Le Friec G, et al. Intracellular complement activation sustains T cell homeostasis and mediates effector differentiation. **Immunity.** 2013 Dec 12;39(6):1143-57.

Liu CC, Manzi S, Kao AH et al. Reticulocytes bearing C4d as biomarkers of disease activity for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** .2005.

Liu CC, Kao AH, Hawkins DM et al. Lymphocyte-bound complement activation products as biomarkers for diagnosis of systemic lupus erythematosus. **Clin Transl Sci** 2009.

Liu CC, Manzi S, Kao AH, Navratil JS et al. Cell-bound complement biomarkers for systemic lupus erythematosus: from benchtop to bedside. **Rheum Dis Clin North Am.** 2011.

Machado RIL, Scheinberg MA, Queiroz MY , et al. Utilização do rituximabe como tratamento para o lúpus eritematoso sistêmico: avaliação retrospectiva. **Einstein** (São Paulo) . 2014 Mar .

Macedo AC, Isaac L. Systemic Lupus Erythematosus and Deficiencies of Early Components of the Complement Classical Pathway. **Front Immunol**. 2016 Feb 24;7:

Manzi S, Navratil JS, Ruffing MJ, et al. Measurement of erythrocyte C4d and complement receptor 1 in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**. 2004.

Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biological amplifier. **Nature**. 1964; 202: 498-9.

Mavragani CP, Fragoulis GE, Somarakis G, et al: Clinical and laboratory predictors of distinct histopathological features of lupus nephritis. **Medicine (Baltimore)** 2015; 94: e829

Mecklenbrauker I, Saijo K & Zheng NY et al. Protein kinase C delta controls self-antigen-induced B-cell tolerance. **Nature**. 2002.

Nakashima CAK, Galhardo AP, Silva JFM, et al. Incidência e aspectos clínico-laboratoriais do Lúpus eritematoso sistêmico em cidade do Sul do Brasil. **Rev. Bras. Reumatol**. 2011

Navratil JS, Manzi S, Kao AH et al. Platelet C4d is highly specific for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum** 2006.

O'Brien L. M., Mastro M. & Fay, P. J. Regulation of factor VIIIa by human activated protein C and protein S: inactivation of cofactor in the intrinsic factor Xase. **Blood**. 2000 Mar 1;95(5):1714-20

Palareti, G, et al. Poor anticoagulation quality in the first 3 months after unprovoked venous thromboembolism is a risk factor for long-term recurrence. **J Thromb Haemost**, 3(5):955-61, 2005.

Palareti, G, et al. DULCI (D-dimer-ULtrasonography in Combination Italian Study) Investigators. Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: analysis of results obtained in the DULCIS study. **Int J Lab Hematol**, Sept 12, 2015.

Peraramelli S, Rosing J, Hackeng TM. TFPI-dependent activities of protein S. **Thromb Res**. 2012 May;129 Suppl 2:S23-6.

Pereira J, Alfaro G, Goycoolea, M, et al. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. Association with increased thrombin generation and procoagulant state. **Thromb Haemost**. 2006 Jan;95(1):94-9. PubMed PMID: 16543967.

Petri M. Lupus in Baltimore: evidence-based 'clinical pearls' from the Hopkins Lupus Cohort. **Lupus**. 2005.

Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat Immunol**. 2010 Sep;11(9):785-97.

Robinson, WH, Mao, R. Biomarkers to guide clinical therapeutics in rheumatology? **Curr Opin Rheumatol**. 2016 Mar;28(2):168-75.

Ruiz-Arguelles, GJ, Ruiz-Arguelles A, Alarco ´n-Segovia D, Drenkard C, et al. Natural anticoagulants in systemic lupus erythematosus: deficiency of protein S bound to C4b-bp associated with recent history of venous thrombosis, antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome. **J Rheumatol** .1991.

Rus V, Atamas SP, Shustova V, et al.Expression of cytokine- and chemokine-related genes in peripheral blood mononuclear cells from lupus patients by cDNA array. **Clin Immunol**. 2002.

Telles RW, Lanna CC, Ferreira GA, et al. Carotid atherosclerotic alterations in systemic lupus erythematosus patients treated at a Brazilian university setting. **Lupus**. 2008.

Tripodi A. D-dimer testing in laboratory practice. **Clin Cm**, 57(9):1256–1262, 2011.

Tripodi A. et al. Position paper on laboratory testing for patients taking new oral anticoagulants. Consensus document of FCSA, SIMeL, SIBioC and CISMEL. **Clin Chem Lab Med**, 50(12):2137-40, 2012.

Thervet E, Anglicheau D, Legendre C. Recent issues concerning renal transplantation in systemic lupus erythematosus patients. **Nephrol Dial Transplant**. 2003.

Versteeg, HH, et al. New Fundamentals in Hemostasis. **Physiol Rev**, 93:327-358, 2013

Vilar MJ, Sato EI. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). **Lupus**. 2003.

Vital EM, Wittmann M, Edward S. et al.: Brief report: responses to rituximab suggest B cell-independent inflammation in cutaneous systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheumatol (Hoboken NJ)** 2015; 67: 1586-91.

Walport MJ, Davies KA, Botto M. C1q and systemic lupus erythematosus. **Immunobiology**. 1998.

Webb JH. Studies on the interaction between vitamin K-dependent protein S and complement regulator C4b-binding protein: localization of binding sites and

identification of a possible function of the complex. **Scand J Clin Lab Invest**
Suppl. 2002;237:19-28.

.

ANEXOS