

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CRISTINA DE MELLO GOMIDE LOURES

**ESTUDO DE FENÓTIPOS CELULARES EM PACIENTES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO, SOB TRATAMENTO**

Belo Horizonte – MG

2014

CRISTINA DE MELLO GOMIDE LOURES

**ESTUDO DE FENÓTIPOS CELULARES EM PACIENTES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO, SOB TRATAMENTO**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientadora Prof^a. Dr^a Maria das Graças Carvalho

Coorientador Prof. Dr Vicente de Paulo C. P. Toledo

Colaboradora Prof^a. Dr^a Tânia Mara Pinto D. Guimarães

Belo Horizonte - MG

2014

Loures, Cristina de Mello Gomide.

L892e Estudo de fenótipos celulares em pacientes com lúpus
eritematoso sistêmico, sob tratamento / Cristina de Mello Gomide
Loures. – 2014.
113 f. : il.

Orientadora: Maria das Graças Carvalho.

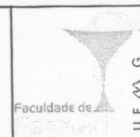
Coorientador: Vicente de Paulo C.P. Toledo.

Colaboradora: Tânia Mara Pinto D. Guimarães.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas.

1. Lúpus eritematoso sistêmico – Teses. 2. Nefrite lúpica –
Teses. 3. Sistema imune – Disfunção – Teses. 4. Fenótipo – Teses.
5. Doenças imunológicas – Teses. I. Carvalho, Maria das Graças. II.
Toledo, Vicente de Paulo C.P. III. Guimarães, Tânia Mara Pinto
Dabés. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de
Farmácia. V. Título.

CDD 616.079



FOLHA DE APROVAÇÃO

ESTUDO DE FENÓTIPOS CELULARES EM PACIENTES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO, SOB TRATAMENTO.

CRISTINA DE MELLO GOMIDE LOURES

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

Aprovada em 18 de fevereiro de 2014, pela banca constituída pelos membros:

Maria das Graças Carvalho
Prof.ª Maria das Graças Carvalho - Orientadora
UFMG

Cristina Lanna
Prof.ª Cristina Costa Duarte Lanna
UFMG

Fernanda Freire Campos Nunes
Dra. Fernanda Freire Campos Nunes
UFMG

Vicente de Paulo Coelho Peixoto Toledo
Prof. Vicente de Paulo Coelho Peixoto Toledo
UFMG

Belo Horizonte, 18 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

À professora Maria das Graças Carvalho pelo apoio, amizade, dedicação e ensinamentos. Muito obrigada por me orientar e permitir a realização deste sonho.

Ao professor Vicente de Paulo Toledo pela colaboração, incentivo, amizade e ensinamentos durante o desenvolvimento deste estudo. Muito obrigada.

Aos médicos Dr. Paulo Madureira de Pádua, Dra Claudia Neiva e Dr Renato Consoli por viabilizarem e apoiarem a realização deste estudo. Muito obrigada.

Aos residentes do ambulatório da Santa Casa pela disposição e interesse em colaborar neste estudo. Muito obrigada.

A Karine Silvestre e Marcos Vinícius pela amizade e companheirismo sempre presentes. Muito obrigada.

Aos amigos dos laboratórios de Hematologia e Imunologia pela amizade e ajuda sempre que necessária. Muito obrigada.

A Luara Santos por me ajudar durante a determinação dos títulos dos anticorpos. Muito obrigada.

Ao prof. Dr Ricardo Gonçalves pelos conhecimentos de citometria e ajuda na montagem do painel de marcação de linfócitos. Muito obrigada.

Ao centro de pesquisa René Rachou - Fiocruz e colaboradores pelo apoio, conhecimentos e suporte na citometria de fluxo. Muito obrigada.

Aos meus pais e meus irmãos por sempre estarem ao meu lado e confiarem em mim. Muito obrigada pelo carinho.

Ao Caio por todo carinho, suporte e incentivo durante todo o período do mestrado. Muito obrigada.

Aos meus amigos que sempre me incentivaram e apoiaram a realização deste sonho. Muito obrigada.

Aos participantes que contribuíram voluntariamente neste estudo que sem a participação destes não seria possível à realização do mesmo.

A todos os professores e mestres que contribuíram com ensinamentos e apoio.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste estudo.

RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é um distúrbio autoimune, multissistêmico, de etiologia ainda não bem esclarecida. É uma doença rara, com a incidência de 8,7 a cada 100.000 habitantes da população brasileira em geral e, frequentemente, em mulheres jovens durante a fase reprodutiva. A disfunção imune presente no LES leva à grande produção de autoanticorpos e imunocomplexos, ativação excessiva do complemento e a um processo inflamatório tecidual insidioso. Dentre as diversas manifestações do LES, a nefrite lúpica (NL) é a mais relevante ocorrendo em até 50% dos pacientes no momento do diagnóstico, e em até 60% dos pacientes durante o curso da doença. A patogênese da doença é extremamente complexa, com diversos estudos evidenciando alterações nos fenótipos linfocitários. O objetivo deste estudo foi determinar as alterações do sistema imune de pacientes com LES em tratamento, e comparar estas alterações nas formas inativa e ativa da doença entre si, e com o grupo controle. Participaram deste estudo um total de 30 pacientes com LES e, como controle, 11 indivíduos sem a doença (CN). Foram avaliados os marcadores de células NK, T e B tais como CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD25, CD56, HLA-DR, NKG2D e FoxP3 em linfócitos do sangue periférico por meio da técnica de citometria de fluxo. A população de células NK se mostrou diminuída apenas em pacientes com a forma ativa da doença, enquanto as populações de células efetoras T CD4⁺, T reguladoras FoxP3⁺ e de células B se mostraram diminuídas em pacientes com LES, em ambas as formas ativa e inativa, quando comparado ao grupo controle. Ao contrário, a população de células T CD8 se mostrou elevada no grupo com LES, nas formas ativa e inativa. Foi também observado um aumento na expressão do marcador de atividade NKG2D em células CD3⁺CD56⁻ em pacientes com nefrite em relação aos não portadores, enquanto as populações de células efetoras T CD4⁺ e de células B se mostraram diminuídas em pacientes com NL quando comparadas ao grupo controle. Ao contrário, a população de células T CD8⁺ se mostrou elevada no grupo com LES com ou sem NL. Quanto aos principais medicamentos utilizados pelos pacientes com LES, o uso de azatioprina não afetou os perfis de expressão das células T, B e NK; tampouco a dose de prednisona. Ao contrário, os usuários de hidroxiquina apresentaram uma maior expressão dos marcadores de células NK em relação aos não usuários. Apesar dos pacientes estudados estarem em tratamento, os dados em conjunto

permitem confirmar disfunção do sistema imune peculiar no LES, bem como variações do perfil fenotípico celular em função do *status* da doença.

PALAVRAS CHAVES: Lúpus eritematoso sistêmico, nefrite lúpica, células T, células B, células NK, células T reguladoras, CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD25, CD56, HLA-DR, NKG2D, FoxP3, azatioprina, prednisona e hidroxicloroquina.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multisystemic autoimmune disorder with an etiology that is not yet well understood. It's a rare disease, with the incidence of 8.7 per 100.000 inhabitants of Brazilian population and often occurring in young women during their childbearing years. The immune dysfunction caused by SLE leads to a large production of autoantibodies and immune complexes, excessive complement activation, and an insidious tissue inflammation. Among the diverse clinical manifestations of SLE, lupus nephritis (LN) is the most relevant in SLE, occurring in 50% of patients at diagnosis and in 60% of patients during the course of the disease. The pathogenesis of the disease is extremely complex, with several studies showing alterations of lymphocyte phenotypes. The aim of this study was to determine the immune system alterations in patients with SLE under treatment and compare such alterations in the active and inactive forms between themselves, and with the controls. We have studied a total of 30 patients with SLE under treatment and, as controls, 11 subjects without the disease. NK, T and B cells markers such as CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD25, CD56, HLA-DR, NKG2D and FoxP3 were assessed in lymphocytes from peripheral blood through flow cytometric assays. NK t cells showed to be decreased only in patients with the active form of the disease, while the TCD4⁺, T reg FoxP3⁺ and B cells populations showed to be decreased in patients with SLE, in both active and inactive forms, as compared to control. Conversely, T CD8⁺ cells population showed to be increased in patients with SLE, with both active and inactive forms. Also, it was observed an increase in the NKG2D activity in CD3⁺CD56⁻ cells in patients carrying lupic nephritis (LN) compared to non carriers, while TCD4⁺ and B cells populations showed to be decreased in patients with LN compared to controls. In contrast, T CD8⁺ cells have been increased in SLE patients with and without LN. Concerning to the main medicines used by patients with SLE, azathioprine intake did not affect the NK, T and B expression profiles, nor even higher or lower prednisone dose. Conversely, hydroxychloroquine users showed a higher expression of NK cells markers compared to non users. In spite of the users to be under treatment, the data taken together allow to confirm the characteristic immune system dysfunction of the SLE, as well variations in the cellular phenotypic profile according to the disease status.

KEY WORDS: Systemic lupus erythematosus, lupus nephritis, T cells, B cells, natural killer cells, regulatory T cells, CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD25, CD56, HLA-DR, NKG2D, FoxP3, azathioprine, prednisone, hydroxychloroquine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fatores patogênicos, formação dos imunocomplexos, autoanticorpos, células autorreativas e dano em diversos órgãos (TSOKOS, 2011).....	23
Figura 2 Células dendríticas ativadas, remoção deficiente dos debris apoptóticos e indução inicial de um quadro inflamatório (CRISPIN <i>et al.</i> , 2010).	26
Figura 3 Gráfico de tamanho (FSC) <i>versus</i> granulosidade (SSC) da população de linfócitos, no destaque, obtidas a partir da análise no Flow Jo™. (A) População de leucócitos com linfócitos em destaque, (B) população de linfócitos após exclusão de monócitos e granulócitos.	50
Figura 4 <i>Dot-plot</i> para avaliação de células B, APC <i>versus</i> PE. (A) Tubo controle sem marcação, (B) marcação de células B e T (CD19 e CD3).	50
Figura 5 Gráfico de granulosidade (SSC) <i>versus</i> APC para evidenciar a marcação de células T (CD3).....	51
Figura 6 <i>Dot-plot</i> para avaliação de células T reguladoras, FITC <i>versus</i> PE, e histograma para avaliação do marcador FoxP3. (A) Tubo controle sem marcação, (B) marcação de células T reguladoras (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺) e a divisão entre população CD25 ^{high} e CD25 ^{int} , (C) histograma para avaliar a expressão de FoxP3 em células CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high} indicada pela seta.....	51
Figura 7 <i>Dot-plot</i> para avaliação de células T, FITC <i>versus</i> PECy5.5, e HLA-DR em células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ . (A) Tubo controle sem marcação, (B) marcação de células T efetoras CD3 ⁺ CD4 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺ , (C) avaliação da expressão de HLA-DR em células CD4 ⁺ , (D) avaliação da expressão de HLA-DR em células CD8 ⁺	52
Figura 8 <i>Dot-plot</i> para avaliação de células NK, APC <i>versus</i> PE. (A) Tubo controle sem marcação, (B) marcação das células NK e suas subpopulações <i>bright</i> e <i>dim</i> , (C) histograma para avaliar a expressão de NKG2D nas células NK <i>bright</i> indicada pela seta.....	53
Figura 9 Estratégia de marcação e análise para avaliação dos marcadores NKG2D e FoxP3.	54
Figura 10 Expressão fenotípica de células CD3 ⁺ CD56 ⁺ (em percentual) para os grupos com a doença ativa (LES-A), inativa (LES-I) e grupo controle (CN). *Mann-Whitney.	60

Figura 11 Expressão fenotípica das populações CD3 ⁻ CD56 ⁺ e CD3 ⁺ CD56 ⁺ (em MFI) em pacientes com e sem nefrite lúpica (NL). *Mann-Whitney.	61
Figura 12 Expressão fenotípica (em percentual) das populações CD3 ⁺ CD4 ⁺ , CD3 ⁺ CD8 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ entre os grupos com a doença ativa (LES-A), inativa (LES-I) e grupo controle (CN). * Mann-Whitney; **T-Student.	63
Figura 13 Expressão fenotípica (em percentual) das populações CD3 ⁺ CD4 ⁺ , CD3 ⁺ CD8 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ entre os grupos com e sem nefrite lúpica (NL) e grupo controle (CN). * Mann-Whitney; ** T-Student.	65
Figura 14 Expressão fenotípica (em MFI) das populações CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ e CD3 ⁺ CD56 ⁻ NKG2D ⁺ entre os grupos com e sem nefrite lúpica (NL) e grupo controle (CN). *Mann-Whitney; ** T-Student.	66
Figura 15 Expressão fenotípica (em percentual e em MFI) de células CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺ entre os pacientes com as formas ativa (LES-A), inativa (LES-I) e grupo controle (CN). **T-Student.	67
Figura 16 Expressão fenotípica (em percentual e em MFI) de células CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺ de pacientes com e sem nefrite lúpica (NL) e grupo controle (CN). **T-Student.	68
Figura 17 Expressão fenotípica (em percentual) de células CD19 ⁺ para os grupos com a doença ativa (LES-A), inativa (LES-I) e grupo controle (CN). *Mann-Whitney.	69
Figura 18 Expressão fenotípica (em percentual) de células CD19 ⁺ entre os grupos com e sem a nefrite lúpica (NL) e grupo controle (CN). *Mann-Whitney.	70
Figura 19 Expressão fenotípica de células CD3 ⁻ CD56, CD3 ⁻ CD56 ^{dim} , CD3 ⁻ CD56 ^{bright} (em percentual) entre usuários ou não de hidroxiclороquina (HCQ) e grupo controle (CN). *Mann-Whitney.	72
Figura 20 Expressão fenotípica (em percentual) da população CD3 ⁻ CD56 ^{bright} NKG2D ⁺ entre os grupos de usuários ou não de hidroxiclороquina (HCQ) e o grupo controle (CN). *Mann-Whitney.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características demográficas dos grupos do estudo.	44
Tabela 2 Fenótipos e características dos respectivos anticorpos monoclonais marcados com os fluorocromos alofocianina (APC), isotiacianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), combinação entre ficoeritrina e cianina (Pe-Cy5.5) e combinação entre PerCP e cianina (PerCP-Cy5.5) do presente estudo.....	49
Tabela 3 Dados laboratoriais dos pacientes com LES na forma ativa ou inativa.....	56
Tabela 4 Principais características dos pacientes do estudo, incluindo idade, sexo, SLEDAI-2K, tratamento e resultado de biópsia renal quando disponível.....	57
Tabela 5 Distribuição dos critérios de diagnóstico do LES de acordo com os acometimentos entre os portadores da doença.	58
Tabela 6 Título calculado <i>versus</i> anticorpos CD25, CD19 e CD56.....	112
Tabela 7 Título calculado <i>versus</i> anticorpos CD3, CD4, CD8 e HLA-DR.	113
Tabela 8 Título calculado <i>versus</i> anticorpos CD16 e NKG2D.	114
Tabela 9 Quantidade de anticorpo utilizado na padronização do marcador FoxP3.	115

LISTA DE FLUXOGRAMA

Fluxograma 1 Procedimentos realizados a partir da coleta das amostras até a análise estatística dos resultados.....	46
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AINE	Anti-inflamatório não esteroidal
ANOVA	Análise de variância
Anti-Ro	Anticorpo contra antígeno Ro
Anti-SM	Anti-Smith
APC	Aloficocianina
AZA	Azatioprina
B8	Sorotipo pertencente ao complexo HLA-B
BANK1	Gene que codifica proteína de linfócitos B
BD	Becton, Dickinson and Company
BILAG	<i>British Isles Lupus Assessment Group</i>
BLK	Gene pertencente à família SRC
BLys	Fator estimulador de linfócitos B
BSA	Albumina sérica bovina
c-Mer quinase	Enzima c-Mer tirosina quinase
C1q	Componente do complexo C1 do complemento
C2	Fração C2 do complemento
C3	Fração C3 do complemento
C4	Fração C4 do complemento
CD1d	Molécula expressa em células NKt
CD3	Molécula expressa em células T
CD4	Molécula expressa em subpopulação de células T
CD8	Molécula expressa em subpopulação de células T
CD16	Molécula expressa em células NK

CD19	Molécula expressa em células B
CD20	Molécula expressa em células B
CD25	Molécula expressa em células T reguladoras e/ou ativadas
CD40L	Molécula expressa em células T ativadas
CD44	Molécula expressa em leucócitos.
CD56	Molécula expressa em células NK
CD69	Molécula expressa em células T e NK ativadas
CD70	Molécula expressa em células T e B ativadas
CN	Controle negativo
COEP	Comitê de ética em pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Enzima desoxirribonuclease
DR3	Sorotipo pertencente ao complexo HLA-DR
EBV	Vírus Epstein-Barr
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Isotiacianato de fluoresceína
FoxP3	Fator de transcrição da família <i>forkhead</i> box P3
FSC	Tamanho
GN	Glomerulonefrite
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
HCQ	Hidroxicloroquina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HLA-DR	Complexo do tipo MHC classe II do antígeno leucocitário humano
IFN- α	Interferon- α
IFN- γ	Interferon- γ

IF	Imunofluorescência
IgE	Imunoglobulina do tipo E
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IgM	Imunoglobulina do tipo M
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-17	Interleucina-17
IL-21	Interleucina-21
ISN	Sociedade Internacional de Nefrologia
ITGAL	Gene que codifica a cadeia L da integrina α de leucócitos
KIR	Receptor da superfamília Ig expresso em célula <i>natural killer</i>
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LES-A	Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico na forma ativa
LES-I	Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico na forma inativa
LYN	Gene pertencente à família SRC
ME	Microscopia eletrônica
MFI	Intensidade média de fluorescência
MHC	Complexo de histocompatibilidade
miRNA	MicroRNA
MMF	Micofenolato de mofetil
MO	Microscopia ótica
MTX	Metotrexato
NK	Células <i>natural killer</i>

NKG2D	Molécula expressa em células NK e T CD8 ativadas
NKp30	Receptor de citotoxicidade natural de células NK
NKp44	Receptor de citotoxicidade natural de células NK
NKp46	Receptor de citotoxicidade natural de células NK
NKt	Células T <i>natural killer</i>
NL	Nefrite lúpica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salínico
PCR	Proteína C reativa
PDN	Prednisona
PDHX	Gene pertencente ao complexo piruvato desidrogenase
PE	Ficoeritrina
PE.Cy5.5	Combinação entre ficoeritrina e cianina
PerCP-Cy5.5	Combinação entre PerCP e cianina
PPP2CA	Enzima envolvida no controle da divisão e crescimento celular
PTPN22	Gene pertencente à família PTP
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
RPS	Sociedade de Patologia Renal
SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
SLAM	<i>Systemic Lupus Activity Measure</i>
SSC	Granulosidade
STAT4	Fator de transcrição da família STAT
TGF- β	Fator de crescimento transformante- β
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TNFAIP3	Gene codificador de TNF
TNFSF4	Gene codificador de TNF

Th	Células T <i>helper</i> (auxiliaries)
Th1	Células T <i>helper</i> (auxiliaries) do tipo 1
Th2	Células T <i>helper</i> (auxiliaries) do tipo 2
Th17	Células T <i>helper</i> (auxiliaries) do tipo 17
Treg	Células T reguladoras
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VHS	Velocidade de hemossedimentação
VR	Valor de referência
$\gamma\delta$	gama/delta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 ASPECTOS GERAIS	22
1.2 FISIOPATOLOGIA	24
1.2.1 Fatores genéticos	24
1.2.2 Influências ambientais	25
1.2.3 Hormônios femininos e sexo	27
1.2.4 Regulação epigenética da expressão gênica	28
1.3 EPIDEMIOLOGIA	30
1.4 DIAGNÓSTICO	31
1.4.1 Nefrite lúpica	33
1.5 TRATAMENTO	35
1.6 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DO LES	37
1.6.1 Imunidade inata	37
1.6.2 Perfil fenotípico de linfócitos	38
2 JUSTIFICATIVA	41
3 OBJETIVOS	42
3.1 GERAL	42
3.2 ESPECÍFICOS	42
4 PACIENTES E MÉTODOS	43
4.1 CASUÍSTICA	43
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	44
4.3 DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES	45
4.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE	45
4.5 IMUNOFENOTIPAGEM	45
4.5.1 Análise ex-vivo do fenótipo celular de linfócitos	45
4.5.2 Titulação dos marcadores de superfície celular	48
4.6 AQUISIÇÃO DOS DADOS	49
4.6.1 Análise convencional de linfócitos	50
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
5 RESULTADOS	56
5.1 POPULAÇÃO ESTUDADA	56
5.2 FENÓTIPOS CELULARES	59
5.2.1 Células NK	59
5.2.2 Células T efetoras	61
5.2.3 Células T reguladoras	66
5.2.1 Células B	68
5.2.2 Tratamento dos pacientes	70

6	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	74
6.1	PACIENTES	74
6.2	CÉLULAS NK.....	74
6.3	CÉLULAS NKT.....	76
6.4	CÉLULAS T EFETORAS.....	78
6.5	CÉLULAS T REGULADORAS.....	80
6.1	CÉLULAS B	81
6.2	LIMITAÇÕES DO ESTUDO	82
7	CONCLUSÃO.....	84
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
	ANEXO I - CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DO LES DE ACORDO COM O AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY (1997)	103
	ANEXO II - ÍNDICE DE ATIVIDADE UTILIZADO NO LES, SLEDAI-2K (SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS DISEASE ACTIVITY INDEX)	104
	ANEXO III - CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DA NL PROPOSTA PELA ISN/RPS (2004).	106
	ANEXO IV – FICHA CLÍNICA DO PACIENTE.....	107
	ANEXO V – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	108
	ANEXO VI – FICHA CLÍNICA DO GRUPO CONTROLE.....	110
	ANEXO VII – RESULTADO DOS VALORES DE P NA COMPARAÇÃO ENTRE DO USO DE MEDICAMENTOS ENTRE PACIENTES.....	111
	ANEXO VIII – DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NESSE ESTUDO.....	112

1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é um distúrbio autoimune, multissistêmico, de etiologia ainda não bem esclarecida. Sabe-se que tal distúrbio é de origem multifatorial e apresenta um forte componente genético (CUI *et al.*, 2013), podendo afetar praticamente qualquer órgão com envolvimento da superexpressão de autoanticorpos contra antígenos nucleares e citoplasmáticos (LU, 2013). As características do LES incluem a produção de autoanticorpos, presença de células T e B hiperreativas, a ativação excessiva do complemento, e a deposição de imunocomplexos em diversos tecidos, como pele, rins, pulmão, coração e sistema nervoso central, o que causa lesão nestes órgãos (AHEARN *et al.*, 2012, RAHMAN *et al.*, 2008). Essas manifestações surgem quando mecanismos de tolerância a antígenos próprios falham (CRISPIN *et al.*, 2010). Apesar das causas exatas do LES ainda não serem totalmente esclarecidas, vários aspectos de um funcionamento anormal do sistema imune já foram demonstrados. A doença 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 do LES através da participação de células dendríticas, neutrófilos e macrófagos (APOSTOLIDIS *et al.*, 2011).

A ação de fatores patogênicos resulta na geração de autoanticorpos, imunocomplexos, células T autorreativas, e citocinas pró-inflamatórias que iniciam ou amplificam a inflamação e o dano em diversos tecidos (**Figura 1**), os quais podem também ser danificados por fatores locais. Os imunocomplexos são formados em grandes quantidades no LES como, por exemplo, anticorpos antinucleares que se ligam em material nuclear abundante presente no sangue e nos tecidos e que não são depurados de forma adequada, pois os receptores para a porção Fc de imunoglobulinas e do complemento estão numericamente e funcionalmente deficientes (RAHMAN *et al.*, 2008). Os imunocomplexos também podem se acumular na pele e no sistema nervoso central. Estes se ligam a receptores expressos por células específicas no tecido e causam um recrutamento de células inflamatórias atraídas pela ativação do sistema do complemento.

Outros autoanticorpos dirigidos contra DNA, fosfolípidios, histonas e ribonucleoproteínas também podem se ligar a tecidos isquêmicos, ativando o sistema do complemento, o que também, leva ao estímulo para infiltração de células inflamatórias nos tecidos (TSOKOS, 2011).

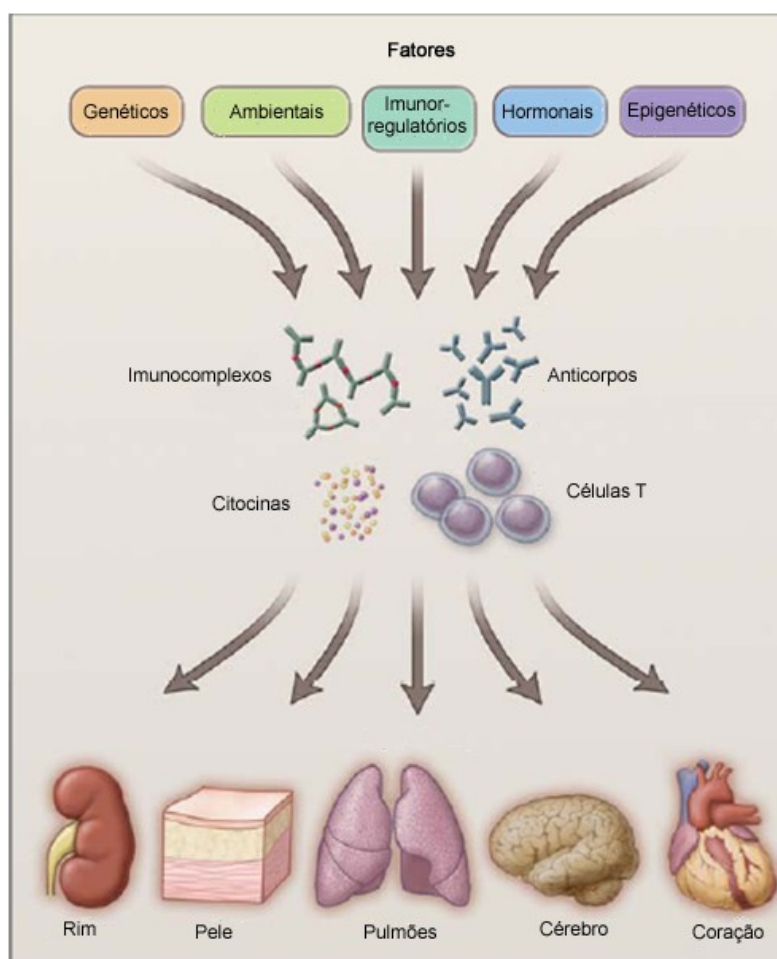


Figura 1: Fatores patogênicos, formação dos imunocomplexos, autoanticorpos, células autorreativas e dano em diversos órgãos (TSOKOS, 2011).

Estudos epidemiológicos indicam o envolvimento de diversos fatores no desenvolvimento da doença, entre esses, os genéticos, epigenéticos, hormonais e ambientais, além da alteração dos fatores imunoreguladores. Tais fatores podem favorecer o aparecimento da autoimunidade (DANCHENKO *et al.*, 2006)

1.2 FISIOPATOLOGIA

1.2.1 Fatores genéticos

Fatores genéticos conferem predisposição para o desenvolvimento do LES. Em raros casos a doença está associada à deficiência de apenas um gene como aqueles que participam na síntese de componentes do complemento tais como C1q e C4 (MOSER *et al.*, 2009). A deficiência de C4 está associada a uma menor eliminação de linfócitos B autorreativos implicando em comprometimento da eliminação de linfócitos produtores de anticorpos de alta avidéz por moléculas próprias, e a deficiência de C1q leva a uma menor eliminação de material de restos celulares o que resulta em um maior recrutamento de células mononucleares (MANDERSON *et al.*, 2004).

Quanto aos fatores genéticos acredita-se que a doença resulte na deficiência combinada de diversos genes. Dessa forma, cada alelo que participa da patogênese contribui minimamente e o efeito acumulativo desses vários genes é necessário para aumentar o risco de desenvolvimento do LES (TSOKOS, 2011). O conhecimento dos fatores genéticos vem crescendo rapidamente, desde 2008, em função do uso da técnica de GWAS (*genome-wide association study*). Os estudos que fizeram o uso dessa técnica identificaram mais de 40 genes associados ao LES. Vários desses genes também estão associados a outras doenças autoimunes o que aponta para um mecanismo molecular semelhante para o desenvolvimento dessas doenças (CUI *et al.*, 2013). Portanto, a identificação e caracterização da função dos genes envolvidos de forma comum nas doenças autoimunes são importantes para elucidar os mecanismos envolvidos na perda da tolerância do sistema imunológico (FLESHER *et al.*, 2010).

Conforme relatado por Rahman *et al.*, 2008, genes do complexo de histocompatibilidade (MHC), particularmente HLA-A1, B8 e DR3 estão relacionados ao lúpus. Diferentes células no sistema imune como células B, macrófagos e células dendríticas atuam como células apresentadoras de antígeno. O genótipo do HLA determina quais moléculas deste complexo estão disponíveis aos antígenos que estão presentes e, dessa forma, o quanto esses antígenos serão reconhecidos pelas células T. Por essa razão alguns genes

particulares estão associados ao risco de resposta a antígenos próprios e aumentam o risco de doenças como o LES.

Na literatura estão descritas alterações em genes envolvidos no estímulo, ativação e produção de anticorpos por células B tais quais os genes LYN, BLK, BANK1 e TNFAIP3 e seriam responsáveis pela ocorrência de células B hiperreativas e produtoras de autoanticorpos no LES (VAUGHN *et al.* 2012). Semelhantemente, também foram observadas alterações em genes envolvidos no estímulo de células T como PTPN22, TNFSF4, STAT4 e CD44-PDHX que causariam uma redução do limiar de ativação de células T, aumento da interação entre células T e células apresentadoras de antígenos e mudança nos perfis de produção de citocinas e respostas efetoras de células Th1, Th2 e Th17 (CUI *et al.*, 2013).

Vários dos 40 genes associados ao LES estão envolvidos em processos importantes na patogênese da doença como a apoptose que não é adequadamente depurada, a diferenciação de linfócitos que leva a um aumento de células pró-inflamatórias, a formação de células B autorreativas, a produção de autoanticorpos, a apresentação de antígenos envolvendo o HLA que ocorre de forma defeituosa e a produção de interferon do tipo 1 que se encontra aumentada em pacientes com LES. Entretanto, alguns dos genes que estão associados ao desenvolvimento do LES possuem função ainda desconhecida (GUERRA *et al.*, 2012).

1.2.2 Influências ambientais

A ocorrência do LES possui uma maior concordância entre gêmeos monozigóticos quando comparada entre gêmeos dizigóticos. Porém, gêmeos monozigóticos que vivem diferentes experiências podem apresentar desfechos distintos com relação ao desenvolvimento do LES, o que demonstra uma grande evidência do impacto do fator ambiental na patogênese da doença (CUI *et al.*, 2013, LU, 2013).

O fumo e a exposição à luz ultravioleta estão bem documentados em estudos epidemiológicos como fatores para o desenvolvimento do LES. Na pele, os queratinócitos que são expostos à luz ultravioleta entram em apoptose e liberam material nuclear que não é depurado de forma adequada levando a um quadro inflamatório (**Figura 2**). A depuração do material nuclear gerado pela morte dos queratinócitos e outras células é mediado pelas proteínas amiloide P sérica, c-Mer quinase, IgM, C1q, e DNase, e uma deficiência genética de qualquer substância citada anteriormente pode levar ao desenvolvimento do LES (TSOKOS, 2011). A remoção dos debris apoptóticos é anormal nos pacientes com a doença. *In vitro*, fagócitos de pacientes com LES englobam muito menos material apoptótico que fagócitos de pessoas saudáveis durante uma cultura de sete dias. O C1q participa da ação de fagócitos por se ligar aos debris celulares que podem ser englobados por macrófagos que possuem em sua superfície receptores para C1q. A deficiência de componentes do complemento como C1q, C2, C4 é um fator que predispõe ao desenvolvimento do LES (RAHMAN *et al.*, 2008).

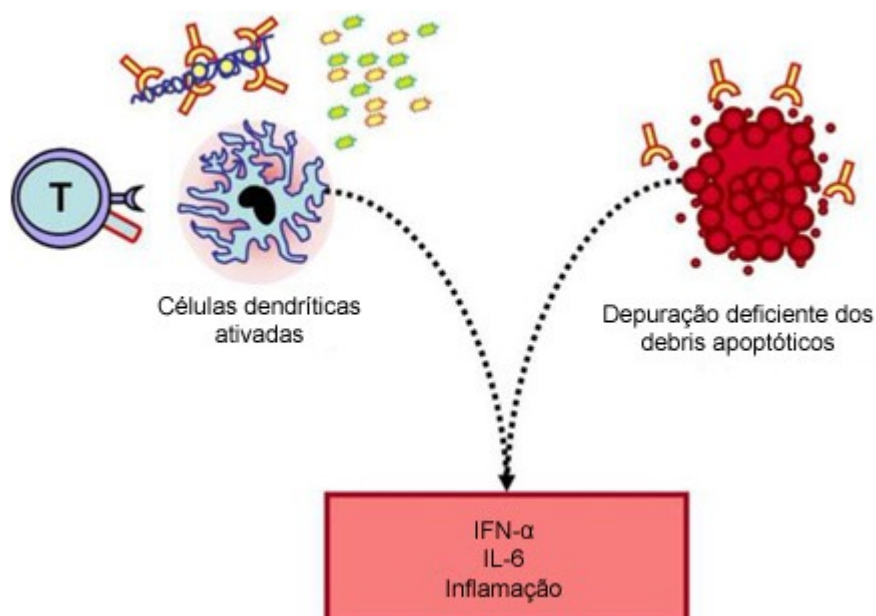


Figura 2: Células dendríticas ativadas, remoção deficiente dos debris apoptóticos e indução inicial de um quadro inflamatório (CRISPIN *et al.*, 2010).

O fumo constitui uma grande fonte de exposição ambiental a agentes químicos tóxicos e a espécies moleculares reativas (COSTENBADER *et al.*, 2004). Estudos prévios apontaram o fumo como um fator de risco para o desenvolvimento do LES, porém o

mecanismo biológico de como este influencia no desenvolvimento da doença ainda não foi elucidado. Presume-se que a associação entre fumo e autoimunidade inclua uma maior alteração e liberação de autoantígenos e mutação de agentes imunoregulatórios por ação de toxinas. Admite-se que a hipóxia tecidual ou a necrose mediada por toxinas possa levar à liberação de antígenos intracelulares e, em conjunto, a uma depuração deficiente, o que levaria ao aumento de células B autoreativas e a síndrome clínica. Pacientes com LES e fumantes, no momento do diagnóstico, possuem uma chance maior de desenvolver poliserosite e problemas neuropsiquiátricos em relação aos não fumantes (COSTENBADER *et al.*, 2004; RUBIN *et al.*, 2005).

A possibilidade que infecções virais possam contribuir para o desenvolvimento da doença vem sendo estudado nos últimos 40 anos. Pacientes com LES apresentam uma soroconversão mais rápida e uma maior carga viral quando há infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV). Uma possível causa para essa sintomatologia pode ser explicada pela similaridade entre o antígeno nuclear 1 do EBV e um autoantígeno comum do LES, o anti-Ro. Também foram observadas mudanças epigenéticas, como a hipometilação do DNA, causadas por algumas medicações, o que tem sido apontado como uma das causas do LES (RAHMAN *et al.*, 2008).

1.2.3 Hormônios femininos e sexo

Hormônios femininos contribuem para o desenvolvimento do LES através de mecanismos ainda não conhecidos e são responsáveis pela maior prevalência da doença no sexo feminino em idade reprodutiva (WECKERLE *et al.*, 2011). Além disso, o cromossomo X também pode contribuir na patogênese independente da participação dos hormônios (RAHMAN *et al.*, 2008). Foi observada a presença de modificações do gene do CD40 ligante (CD40L), localizado no cromossomo X, que causaria uma estimulação excessiva de células T e B (LU *et al.*, 2007). A gravidez pode agravar o LES, mas ainda não está claro como os níveis de progesterona e estradiol contribuem para isso. Foi observado que o nível desses hormônios é menor durante o segundo e o terceiro trimestres da gravidez em pacientes com LES quando comparado aos níveis em mulheres saudáveis.

Para reverter esse quadro, o tratamento com dehidroepiandrosterona mostrou um efeito clínico benéfico (TSOKOS, 2011). Gravidez em pacientes com LES constitui um desafio clínico e envolve a participação de diversos especialistas no acompanhamento dessas pacientes.

1.2.4 Regulação epigenética da expressão gênica

A epigenética é o campo que estuda modificações hereditárias que regulam a expressão gênica, porém não alterando a sequência do DNA (BIRD, 2007). Os mecanismos epigenéticos mais comuns incluem a metilação do DNA, modificação de histonas e regulação mediada por microRNA. Tais mecanismos possuem papéis importantes em modular a expressão gênica durante o ciclo celular, na hereditariedade e na função celular através do corpo (LAURENT *et al.*, 2010). Como o sistema imune está sob controle a nível epigenético, as anormalidades na regulação epigenética podem contribuir para as anormalidades do sistema imune e influenciar nas manifestações de doenças autoimunes (DAI *et al.*, 2011).

A ação dos fatores de transcrição nas cadeias de DNA, portanto, a expressão gênica, é regulada pela metilação do próprio DNA e pela modificação de histonas através da acetilação ou metilação. Hidralazina e procainamida inibem a metilação do DNA em células T e podem induzir a manifestação do LES em pessoas saudáveis. São encontradas evidências que regiões de regulação no DNA de alguns genes envolvidos na patogênese da doença, como por exemplo, ITGAL, CD40L, CD70 e PPP2CA estão hipometilados. Conseqüentemente, a hipometilação do DNA pode causar um aumento na produção de citocinas, hiperatividade de linfócitos T CD4⁺ e aumentar a produção de imunoglobulinas pelos linfócitos B (LU, 2013, CUI *et al.*, 2013).

Alterações no DNA observadas em células T CD4⁺ também podem contribuir para patogênese do LES como observado por COIT *et al.*, 2013. Este autor observou alterações na metilação do DNA de células T CD4⁺ em pacientes com LES, alterações essas que causam uma reação hiper-responsiva ao interferon do tipo I nas células T. As células T de pacientes com LES apresentam numerosas anomalias funcionais que contribuem para patogênese da doença e servem como potenciais biomarcadores. Estas possuem alta capacidade em aderir e migrar para o tecido inflamado contribuindo para o dano do órgão infiltrado em pacientes com LES (CRISPIN *et al.*, 2010).

Histonas são as principais proteínas dos nucleossomos, que constituem a unidade básica da cromatina e auxiliam na determinação de qual parte da cromatina está acessível para transcrição (LUGER *et al.*, 2012). Modificações nas histonas podem alterar a estrutura da cromatina e, dessa forma, alterar a expressão gênica. Foram observados em células T CD4⁺ de pacientes com LES níveis mais baixos de histonas metiladas ou acetiladas (HU *et al.*, 2008). Também foram observadas hiperacetilação de histonas e superexpressão de genes em monócitos de pacientes com LES (ZHANG *et al.*, 2010). Esses achados apontam para uma vasta lista de modificações nas histonas de células do sistema imune de pacientes com LES, e tais modificações podem contribuir na elucidação da patogênese da doença (LIU *et al.*, 2013).

Mais recentemente, foram descobertos os microRNAs (miRNAs) que são pequenos ácidos ribonucleicos (RNA), de 20 a 24 pares de bases de extensão, não codificadores e que possuem o importante papel na regulação da expressão gênica após a transcrição. Podem regular de centenas a milhares de miRNA, e apenas um miRNA pode ser alvo de múltiplos miRNA. A produção dos miRNAs também está sob controle genético e de regulações epigenéticas (FABIAN *et al.*, 2010). Evidências acumuladas indicam que miRNAs são críticos não apenas no desenvolvimento do sistema imune, mas também na regulação das respostas dos sistemas inato e adaptativo (XIAO *et al.*, 2009). Portanto, anormalidades na expressão e no funcionamento dos miRNAs foram identificadas como parte da patogênese das doenças autoimunes inclusive o LES (SHEN *et al.*, 2012).

Foram identificados vários miRNAs que estão expressos de forma defeituosa no LES. Essa expressão defeituosa contribui para a hipometilação do DNA, na perda da tolerância dos linfócitos T e B, e na produção de autoanticorpos (LU, 2013). Segundo Grammatikos *et al.*, 2012, o desenvolvimento de doenças autoimunes é decorrente da combinação de uma série de fatores que predispõe ao seu desenvolvimento como fatores ambientais, fatores genéticos e epigenéticos, além de infecções subclínicas.

1.3 EPIDEMIOLOGIA

Evidências apontam que variações geográficas podem determinar diferenças no desenvolvimento, na frequência de envolvimento em determinado órgão e nos achados imunológicos do LES (BORBA *et al.*, 2013). O LES é uma doença rara, incidindo mais frequentemente em mulheres jovens durante a fase reprodutiva, na proporção de nove a dez mulheres para cada homem. Os índices de incidência na população em geral variam de 1,0 na Dinamarca (BORCHERS *et al.*, 2010) para 8,7 no Brasil a cada 100,000 habitantes (VILAR *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 apresentam uma incidência do LES menor que a de outros grupos étnicos (BORCHERS *et al.*, 2010). Por outro lado, outros estudos epidemiológicos apontam para uma maior prevalência e gravidade da doença na população asiática (JAKES *et al.*, 2012).

Apesar do LES afetar mais mulheres que homens, existem variações entre as populações na relação entre mulheres/homens e na idade de desenvolvimento da doença. A média de idade de desenvolvimento ou de diagnóstico da doença é maior em pacientes de descendência europeia quando comparado a pacientes da África, Ásia, América Central, América do Sul ou em populações indígenas (BORCHERS *et al.*, 2010). Conforme relatado por Schwartzman-Morris *et al.*, 2012, muitos investigadores têm estudado as disparidades relacionadas à epidemiologia da doença, os quais têm sugerido que o sexo, o grupo étnico, a idade de diagnóstico, e o perfil de produção de anticorpos

constituem meios de identificar subgrupos no LES e, dessa forma, melhores estratégias de tratamento que beneficiem cada subgrupo podem ser estabelecidas.

A maioria dos estudos epidemiológicos do LES foi realizada nos Estados Unidos ou na Europa (VILAR *et al.*, 2003). 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 (BORBA *et al.*, 2013). Os estudos atuais sobre incidência no Brasil foram feitos com pequeno número de pacientes, o que dificulta uma conclusão definitiva a respeito da incidência do lúpus no país. A relação entre mulheres e homens no Brasil é de 11,3 mulheres para cada homem, e a idade média de desenvolvimento e diagnóstico da doença é de 31 anos (BORBA *et al.*, 2013).

O LES apresenta um padrão de mortalidade bimodal. As causas principais de mortalidade no início da doença são representadas por perda de função de órgão e por infecções em decorrência dos períodos de ativação. Nas fases tardias da doença, a causa principal de mortalidade é a ocorrência de eventos cardiovasculares. Eventos vasculares atribuídos à aterosclerose são mais comuns em pacientes com LES quando comparados a pessoas saudáveis e podem ocorrer de forma mais precoce que na população em geral (KOJURI *et al.*, 2012; RAHMAN *et al.*, 2008).

1.4 DIAGNÓSTICO

O nome lúpus é derivado do latim lobo e o termo médico foi utilizado pela primeira vez por Rogerius no século 13 para descrever o eritema malar. No século 19 a doença foi pela primeira vez descrita como sistêmica por Cazenave e, posteriormente, Hebra e Kaposi diferenciaram o quadro sistêmico das formas discoides do lúpus. Conforme relatado por Benedek, 1997, entre 1895 e 1903, Osler descreveu dois casos de LES em um grupo de 29 pessoas com o quadro de eritema, tendo dessa forma contribuído para definir muitos aspectos da doença como é conhecida hoje (HEPBURN, 2001). Apesar de o termo lúpus eritematoso ter surgido no século 19 para descrever lesões de pele, foram necessários quase 100 anos para se estabelecer que a doença sistêmica é causada por

uma resposta imune desregulada levando a um quadro inflamatório e dano em praticamente todos os órgãos (TSOKOS, 2011).

O LES é caracterizado por períodos de alta atividade (*flares*) alternados por períodos de remissão (SCHWARTZMAN-MORRIS *et al.*, 2012). Constitui uma das doenças que apresenta maior diversidade de manifestações clínicas e alterações sorológicas entre pacientes. A disfunção imune leva à grande produção de autoanticorpos e imunocomplexos, ativação excessiva do complemento, e a um processo inflamatório tecidual insidioso. Todas essas alterações em conjunto causam a síndrome clínica do LES, com envolvimento de diversos órgãos e um percurso difícil de ser previsto. Os órgãos não são afetados ao mesmo tempo e o envolvimento de um órgão específico não se manifesta igualmente entre pacientes diferentes. O grau de envolvimento de um órgão específico também pode variar ao longo do tempo (CRISPIN *et al.*, 2010).

Vários esforços têm sido envidados para melhor entender a fisiopatogenia do LES por meio do desenvolvimento de novos testes diagnósticos e de biomarcadores capazes de monitorar a doença de forma a melhorar o cuidado ao paciente. A grande heterogeneidade das manifestações do LES leva a uma importante demanda por biomarcadores que possam diferenciar, determinar, monitorar, ou prever o grau de envolvimento de algum órgão específico (LIU *et al.*, 2013).

Na prática clínica o diagnóstico de LES é feito através dos critérios de classificação propostos pelo American College of Rheumatology em 1982 (TAN *et al.*, 1982) os quais foram revisados em 1997 (HOCHBERG, 1997). O diagnóstico do LES é estabelecido quando, pelo menos, quatro critérios estão presentes entre os 11 padronizados (**Anexo I**). A definição dos critérios da doença foi importante para uniformizar o diagnóstico da doença e os estudos científicos. Embora raro, é possível que alguns pacientes com lúpus não apresentem pelo menos os quatro 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 (BORBA *et al.*, 2008).

Um índice muito utilizado de atividade atualmente utilizado no LES é o SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*). Esse índice foi desenvolvido e validado em 1985 em Toronto por reumatologistas experientes como um índice clínico para avaliar a atividade da doença, o qual se mostrou sensível e aplicável na clínica e na pesquisa (GLADMAN *et al.*, 2002). O SLEDAI é composto por 24 itens, dos quais 16 são clínicos, e a manifestação é registrada se ocorrida nos últimos 10 dias, independente se a condição do item melhorou ou piorou. Cada item recebe um peso de 1 a 8 de acordo com sua importância ou gravidade. A sua soma resulta em um índice final correlacionando com a gravidade da doença, não ultrapassando o máximo de 105 (YEE *et al.*, 2009). Escores superiores a três ou quatro indicam doença ativa (YEE *et al.*, 2011). 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 (FREIRE *et al.*, 2011). No ano 2000, Gladman *et al.* fizeram uma revisão do SLEDAI original dando origem ao SLEDAI-2K (**Anexo II**).

Outros índices também podem ser utilizados para avaliação da atividade do LES, entre estes, o BILAG (*British Isles Lupus Assessment Group*) e o SLAM (*Systemic Lupus Activity Measure*). O índice BILAG é composto de oito sistemas orgânicos que são avaliados separadamente através das letras A, B, C, D e E. A letra E significa que o sistema não tem envolvimento com a doença, porém a avaliação da atividade da doença pode evoluir progressivamente até a letra A que significa acometimento grave. Os sistemas avaliados pelo BILAG são distribuídos em sintomas gerais, mucocutâneo, respiratório, cardiovascular, neurológico, mucoesquelético, renal e hematológico (FREIRE *et al.*, 2011). Por sua vez, o índice SLAM avalia 31 parâmetros da doença e cada parâmetro recebe um valor numérico de 0 a 3 de acordo com a gravidade. Após o somatório de todos os valores determina-se a atividade geral da doença (LAM *et al.*, 2005).

1.4.1 Nefrite lúpica

A doença renal crônica constitui um problema de saúde pública de alta prevalência, morbidade, mortalidade e com altos custos para manutenção dos pacientes renais crônicos nas diversas formas de terapia (FERRAZ *et al.*, 2010). No Brasil, assim como

em vários outros países, as doenças glomerulares constituem uma etiologia frequente de insuficiência renal crônica.

A nefrite lúpica (NL) é a manifestação clínica mais relevante no LES, ocorrendo em até 50% dos pacientes no momento do diagnóstico, e em até 60% dos pacientes durante o curso da doença (IWATA *et al.*, 2011). O curso clínico da NL varia desde a presença de hematúria assintomática até a síndrome nefrótica ou lesão renal aguda. Cerca de 10 a 15 % dos pacientes com NL evoluem para doença renal em estágio final e necessitam de diálise (MAVRAGANI *et al.*, 2003). No rim, imunocomplexos se acumulam inicialmente nos espaços subendoteliais e mesangiais. Em seguida, estes se depositam na membrana basal e em áreas subepiteliais, enquanto células T infiltram os tecidos, inclusive o renal, e contribuem para o dano. Muitas dessas células são CD3⁺CD4⁻CD8⁻ e secretam IL-17 de forma a contribuir para o aumento da inflamação através do recrutamento de células polimorfonucleares. Células constitutivas dos tecidos também contribuem para manifestação e piora da doença. Nos rins, células mesangiais, intersticiais e podócitos adquirem capacidade de apresentação de antígenos e de secretar citocinas pró-inflamatórias quando estimuladas por interferon γ (IFN- γ) (TSOKOS, 2011).

A identificação de biomarcadores específicos que possam ser utilizados para diagnosticar precocemente, dimensionar sua gravidade e monitorar a resposta ao tratamento na NL é de grande importância clínica, podendo prevenir lesões renais permanentes e o contínuo declínio da função renal (HEINLEN *et al.*, 2007). Atualmente, o diagnóstico e prognóstico da nefrite é determinada pela quantificação de marcadores circulantes de função renal como creatinina e uréia sérica, de frações C3 e C4 do sistema do complemento, e de autoanticorpos como anticorpo anti-DNA dupla-fita (ROVIN *et al.*, 2009). Porém esses marcadores utilizados no acompanhamento dos pacientes com NL não possuem sensibilidade de detecção precoce de falha do tratamento. Dessa forma, configura-se a necessidade da identificação de novos biomarcadores mais sensíveis e específicos para o diagnóstico e monitoramento da doença renal, visando identificar mais rapidamente a ocorrência de um quadro inflamatório ativo, prevenindo assim o dano irreversível do rim dos pacientes com NL (LIU *et al.*, 2013).

A biópsia renal é padrão ouro para avaliação do tipo e gravidade da lesão renal. Essa é importante para orientar o manejo terapêutico e avaliação prognóstica dos pacientes com NL (BATAL *et al.*, 2012). Observou-se nos primeiros estudos realizados em biópsias renais de pacientes com NL que a evolução da doença estava diretamente relacionada ao grau e extensão da inflamação do compartimento glomerular (SOARES *et al.*, 2005). As alterações da morfologia glomerular encontradas nessas biópsias incluem lesões mesangiais, endoteliais e epiteliais. As lesões mesangiais apresentam hiperplasia e acúmulo de matriz extracelular de células mesangiais causadas pela presença de imunocomplexos. As lesões endoteliais são caracterizadas por um componente exudativo com a presença de infiltração leucocitária, lesão endotelial e proliferação endocapilar. Essa lesão está associada à destruição da parede endotelial, ao acúmulo moderado de imunocomplexos e a graus variados de proliferação de células mesangiais. As lesões epiteliais são causadas pela presença de anticorpos e complemento levando à citotoxicidade dos podócitos, e forma uma lesão não exudativa e não proliferativa da parede capilar dos glomérulos. É comum que mais de um tipo de lesão glomerular exista ao mesmo tempo na NL (WEENING *et al.*, 2004). A primeira classificação das lesões na NL foi proposta pela OMS, publicada em 1974, e sofreu modificações em 1982 e 1995. Em função dos avanços na compreensão da NL e aos trabalhos de correlação entre a clínica dos pacientes e as alterações patológicas, a Sociedade Internacional de Nefrologia (ISN) e a Sociedade de Patologia Renal (RPS) realizaram uma revisão da classificação da OMS em 2003. A nova classificação mantém a simplicidade da classificação de 1974, mas apresenta modificações em relação a diferenças quantitativas e qualitativas entre as lesões de classe III e IV (SOARES *et al.*, 2005, WEENING *et al.*, 2004). A classificação ISN/RPS pode ser visualizada na (**Anexo III**).

1.5 TRATAMENTO

Os regimes de tratamento atuais incluem três grandes classes de medicamentos, os corticoesteróides, 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 corticosteroides podem resultar, a longo

prazo, em catarata, infecções, obesidade, osteoporose, hipertensão e diabetes (STRAND *et al.*, 2013).

O manejo terapêutico depende do tipo de manifestação do LES ou da gravidade do envolvimento do órgão afetado (TERRIER *et al.*, 2012). Azatioprina, micofelato de mofetil e o metotrexato podem ser utilizados em pacientes sem respostas aos regimes tradicionais. A doença leve na pele pode ser tratada com corticosteroides tópicos ou antimaláricos orais, sendo mais utilizada a hidroxicloroquina. Porém, nas manifestações de pele mais graves, terapias imunossupressoras mais agressivas são necessárias. O sintoma da artrite pode ser tratado com anti-inflamatórios não esteroidais orais (AINES) se leve, todavia, em casos mais graves pode-se fazer uso do metotrexato. Os sintomas de serosites, pleurite ou pericardite, podem inicialmente responder ao uso de AINE, mas alguns pacientes com serosite de grau leve e a maioria com serosite moderada precisam de doses moderadas a altas de corticosteroides orais. Serosites graves ou refratárias precisam de terapia imunossupressiva intensa. Corticosteroides sistêmicos são usados para tratar muitas manifestações do LES em baixas, médias ou altas doses ou ainda em pulsoterapia venosa dependendo da gravidade do estado do paciente. Azatioprina, metotrexato, ciclofosfamida ou micofelato de mofetil, em combinação ou não, podem ser usados em *flares* de moderados a graves em manifestações do LES de grandes órgãos. Pulsoterapia de ciclofosfamida ou micofelato de mofetil, ambos em combinação com corticosteróides, são utilizados como terapia de manutenção na NL de moderada a grave. Esses agentes imunoterapêuticos possuem ação ampla e não específica para o sistema imune ou para o LES. Essas limitações mostram a necessidade de novas drogas mais específicas e com melhor risco/benefício no tratamento do LES (BOYCE *et al.*, 2012).

As células B produzem o fator estimulador de linfócitos B (BLyS) que é expresso como uma proteína transmembrana em monócitos, macrófagos e células dendríticas (MACKAY *et al.*, 2009). 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 (LIU *et al.*, 2013). 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 (BOYCE *et al.*, 2012).

1.6 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DO LES

1.6.1 Imunidade inata

As células *natural killer* (NK) são um importante grupo pertencente à imunidade inata e possuem a função de vigilância na defesa contra vírus, bactérias intracelulares e células cancerosas por exercerem atividade diretamente citotóxica ou por meio da secreção de citocinas. Dessa forma, estas podem influenciar e regular a atividade da imunidade adaptativa, incluindo células T e células dendríticas. O papel das células NK e suas subpopulações nas doenças autoimunes também pode envolver as células dos tecidos que se tornam alvos. 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 (SCHLEINITZ *et al.*, 2010).

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} (10%) e as de baixa densidade são chamadas de CD56^{dim} (90%) que são biologicamente distintas após a ativação (YAP, 2010). As células NK CD56^{bright} proliferam e produzem uma grande variedade de citocinas, como por exemplo, IFN- γ , fator de necrose tumoral, IL-10 e quimiocinas, mas apresentam atividade citotóxica mínima. Já as células NK CD56^{dim} apresentam pouca proliferação, produzem quantidades relativamente menores de citocinas, mas possuem atividade altamente citotóxica.

Estudos prévios, como o de Green *et al.*, 2005, identificaram menos células NK e diminuição da citotoxicidade em pacientes com LES, enquanto Park *et al.*, 2009, sugeriu que a diferenciação de células NK está prejudicada no LES, o que poderia contribuir para o desequilíbrio do sistema imunológico, mas também poderia indicar um possível papel

de controle na autoimunidade. Vários estudos indicam que células NK constituem numa população heterogênea e que pode existir um tipo regulatório que mantém a homeostase nas condições fisiológicas e patológicas. 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.

Todas as células NK e algumas células T, especialmente do tipo CD8, possuem um receptor de membrana expresso na superfície denominado NKG2D. Em células NK, o NKG2D é um receptor de ativação e indução da citotoxicidade, porém em células T, para que essa ativação ocorra também são necessários outros sinais co-estimulatórios. Uma série de evidências apontam para um envolvimento das vias de ativação do NKG2D no desenvolvimento das doenças imunomediadas (STEIGERWALD *et al.*, 2009).

1.6.2 Perfil fenotípico de linfócitos

A importância das células T no LES é bem documentada na literatura. O desequilíbrio no número de células T auxiliares (Th) e a deficiência das células T reguladores (Treg) estão envolvidos 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 secretam IL-4, e as células Th17, mais recentemente descritas na literatura, secretam IL-17A. Vários estudos em humanos apontam um papel patogênico das células Th no LES (DOLFF *et al.*, 2011, MIYAKE *et al.*, 2011, XING *et al.*, 2012). Esses estudos observaram uma alteração no perfil de TH1/TH2 e imagina-se que esse fato contribua para a patogênese da doença (SHIN *et al.*, 2011). Coz *et al.*, 2013, reportou uma diminuição de células TH1 e um aumento de células TH2 em sangue periférico de pacientes com LES. Esse resultado também foi observado por Dolff *et al.*, 2011, que também reportou uma diminuição das células TH1 e um aumento na relação TH17/TH1. 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 (YU *et al.*, 2012). Segundo Basu *et al.*, 2009, o receptor de imunoglobulinas de células NK (KIR) é expresso de forma aberrante em células T de pacientes com LES, cuja expressão possui correlação com o índice de atividade da doença, SLEDAI, servindo essa característica como potencial

biomarcador da doença. 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 (DAI *et al.*, 2011). As células T que não expressam CD4 ou CD8 constituem em uma pequena população (< 5% de células T) em indivíduos saudáveis, mas estão significativamente expandidas em pacientes com LES. De acordo com Crispin *et al.*, 2008, essas células podem secretar citocinas como IL-17 e induzir a produção de anticorpo anti-DNA dupla-fita por células B autoreativas e se infiltrar nos rins de pacientes com NL. Nesse caso, as células T participam na modulação da resposta de células B e no estímulo para produção de autoanticorpos, além de controlar as funções e expansão de células Th. As células T também infiltram o tecido renal e lesam o parênquima via atividade citotóxica ou através do recrutamento de macrófagos e células NK (FOSTER, 2007).

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 (BONELLI *et al.*, 2009). Um tipo de Treg regula a resposta imune por meio da secreção de citocinas como IL-10 e TGF- β , mas também existe um outro tipo que é caracterizado pela expressão de CD25, o qual realiza seu efeito supressor via contato com outra célula (MIYARA, 2005). As células Treg possuem a ação de suprimir as respostas de células T autorreativas e, portanto, quando seu número ou função está diminuído favorece o desenvolvimento de doenças autoimunes. 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 (BONELLI *et al.*, 2008). A expressão do fator de transcrição FoxP3 é necessária para a 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 (GERLI *et al.*, 2009). A maioria dos estudos descrevem números reduzidos e função prejudicada nas células Treg no LES (BONELLI *et al.*, 2008, VALENCIA *et al.*, 2007). Já outros grupos falharam em observar essas alterações, no entanto foi observada resistência da célula T efetora à ação regulatória das células Treg (ALUNNO *et al.*, 2012).

Evidências demonstram um papel primário das células B no desenvolvimento do LES. Modelos animais com ausência de células B não desenvolvem a doença. O LES ativo está associado ao quadro de linfopenia com diminuição de células B, e também à expansão de certos tipos celulares como plasmócitos jovens e células imaturas em sangue periférico (LOONEY *et al.*, 2004). Em adição, já foram documentadas a hiperreatividade de células B e produção espontânea de anticorpos no LES por meio de mecanismos ainda não elucidados (MOK, 2010). 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. 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. A apresentação de antígenos 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 (FOSTER, 2007).

2 JUSTIFICATIVA

A patogênese do LES é extremamente complexa, com vários estudos evidenciando a participação de diferentes fenótipos linfocitários na patogênese da doença. Porém na população brasileira ainda não foi estudado as alterações de fenótipos linfocitários. O conhecimento desses fenótipos pode contribuir para elucidar a fisiopatologia desta doença com suas diversas implicações clínicas e pode ser importante para o desenvolvimento de novos biomarcadores e tratamento. A resposta ao tratamento existente é bastante heterogênea entre os pacientes. Assim, o tratamento convencional pode apresentar eficácia para alguns pacientes, enquanto outros voltam a apresentar a doença na forma ativa. Diante do exposto acima, o presente estudo pretende caracterizar pela primeira vez na população brasileira, a disfunção da imunorregulação em pacientes com LES em tratamento, sob controle ou não, respondendo algumas questões, tais como:

- As populações de linfócitos T, B e NK apresentam diferença segundo o desfecho clínico em pacientes com LES em tratamento? Em outras palavras, há diferenças nos fenótipos das populações de linfócitos T, B e NK naqueles pacientes em tratamento cuja doença está em atividade comparado àqueles nos quais a doença permanece controlada?
- Se há alterações fenotípicas quanto às populações de linfócitos T, B e NK, entre aqueles com a doença em atividade ou não apesar do tratamento, estas correlacionam com a presença ou ausência de NL?

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Determinar os fenótipos de linfócitos T, B e NK em pacientes com LES em tratamento, comparando-os nas formas inativa e ativa da doença entre si e com um grupo controle.

3.2 ESPECÍFICOS

– Caracterizar imunofenotipicamente linfócitos T, B e NK do sangue periférico, identificando populações celulares, através dos seguintes marcadores:

A – Linfócitos T: CD3, CD4, CD8, CD25, FoxP3, HLA-DR

B – Linfócitos B: CD19

C – Células NK: CD16, CD56, NKG2D

– Comparar os fenótipos celulares em pacientes com LES, com e sem nefrite lúpica (NL);

– Comparar os fenótipos celulares segundo o uso de medicamentos mais utilizados na população estudada.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Pacientes com diagnóstico de LES, segundo a *American College of Rheumatology* (ACR), em tratamento foram recrutados sequencialmente no ambulatório de Reumatologia da Santa Casa de Belo Horizonte no Centro de Especialidades Médicas coordenado pelo Dr. Paulo Madureira de Pádua, ou entre pacientes internados no Hospital da Santa Casa no período de fevereiro a setembro de 2013. No presente estudo, foi utilizada uma amostra de conveniência com 30 pacientes, incluindo 28 mulheres e 2 homens que foram atendidos pelos médicos residentes que obtiveram os dados clínicos utilizados e com base nesses, o SLEDAI-2K foi calculado. Também foram convidados 11 indivíduos sem a doença para compor o grupo controle. Os participantes foram distribuídos em grupos conforme mostrado abaixo:

Grupo 1: indivíduos voluntários sem de LES (grupo controle) com n=11;

Grupo 2: pacientes voluntários com LES, em tratamento, com a forma inativa da doença, score do SLEDAI-2K de até 4 (YEE *et al.*, 2011) (método), com n=18;

Grupo3: pacientes voluntários com LES, em tratamento, com a forma ativa da doença, score do SLEDAI-2K acima de 4 (YEE *et al.*, 2011); com n=12;

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.

As informações obtidas dos pacientes em relação à idade, sexo e atividade da doença estão descritas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Características demográficas dos grupos do estudo.

Grupos	LES-A (n=12)	LES-I (n=18)	CN (n=11)	Valor p
Sexo				
Feminino n (%)	11 (91,7)	17 (94,4)	10 (90,9)	-
Masculino n (%)	1 (8,3)	1 (5,6)	1 (9,1)	-
Idade (anos)	40	28	28	0,267*
SLEDAI-2K (mediana)	9	1	-	< 0,001**

CN: grupo controle; LES-A: portadores de LES na forma ativa; LES-I: portadores de LES na forma inativa. *Kruskal-Wallis; ** Mann-Whitney

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram selecionados pacientes portadores de LES segundo os critérios de classificação da *American College of Rheumatology* (ACR), em tratamento, com a doença em atividade ou não, acima de 18 anos. Conforme grupos definidos anteriormente, a seleção estava a cargo dos reumatologistas do Serviço de Reumatologia da Santa Casa de Belo Horizonte. Foram excluídos pacientes portadores de outras doenças autoimunes associadas, doenças infecciosas, doenças imunossupressoras inclusive HIV/AIDS e pacientes que não autorizaram e/ou não assinaram o termo de consentimento da pesquisa (**Anexo V**). Quanto ao grupo controle foram selecionados indivíduos sem a doença e sem histórico familiar de LES, acima de 18 anos e de ambos os sexos, porém nenhuma análise laboratorial foi realizada. O grupo controle foi avaliado em relação às doenças relacionadas acima por meio de um questionário elaborado para tal finalidade (**Anexo VI**). Dessa forma, outras doenças autoimunes foram excluídas.

4.3 DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES

Os dados clínicos foram obtidos por meio da análise dos prontuários dos pacientes, e o diagnóstico da nefrite lúpica foi realizada de acordo com o resultado confirmatório da biópsia renal. Porém uma paciente ainda não havia sido submetida à biópsia, todavia apresentava proteinúria de 5,891 g/24horas e, dessa forma, também foi classificada nesse estudo como portadora de nefrite lúpica.

Os dados laboratoriais dos pacientes foram obtidos por meio da análise dos respectivos prontuários. Os exames de PCR, C3 e C4 foram realizados pelo método de imunoturbidimetria. A contagem de leucócitos foi realizada por método automatizado e o VHS pelo método de Westergreen.

4.4 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

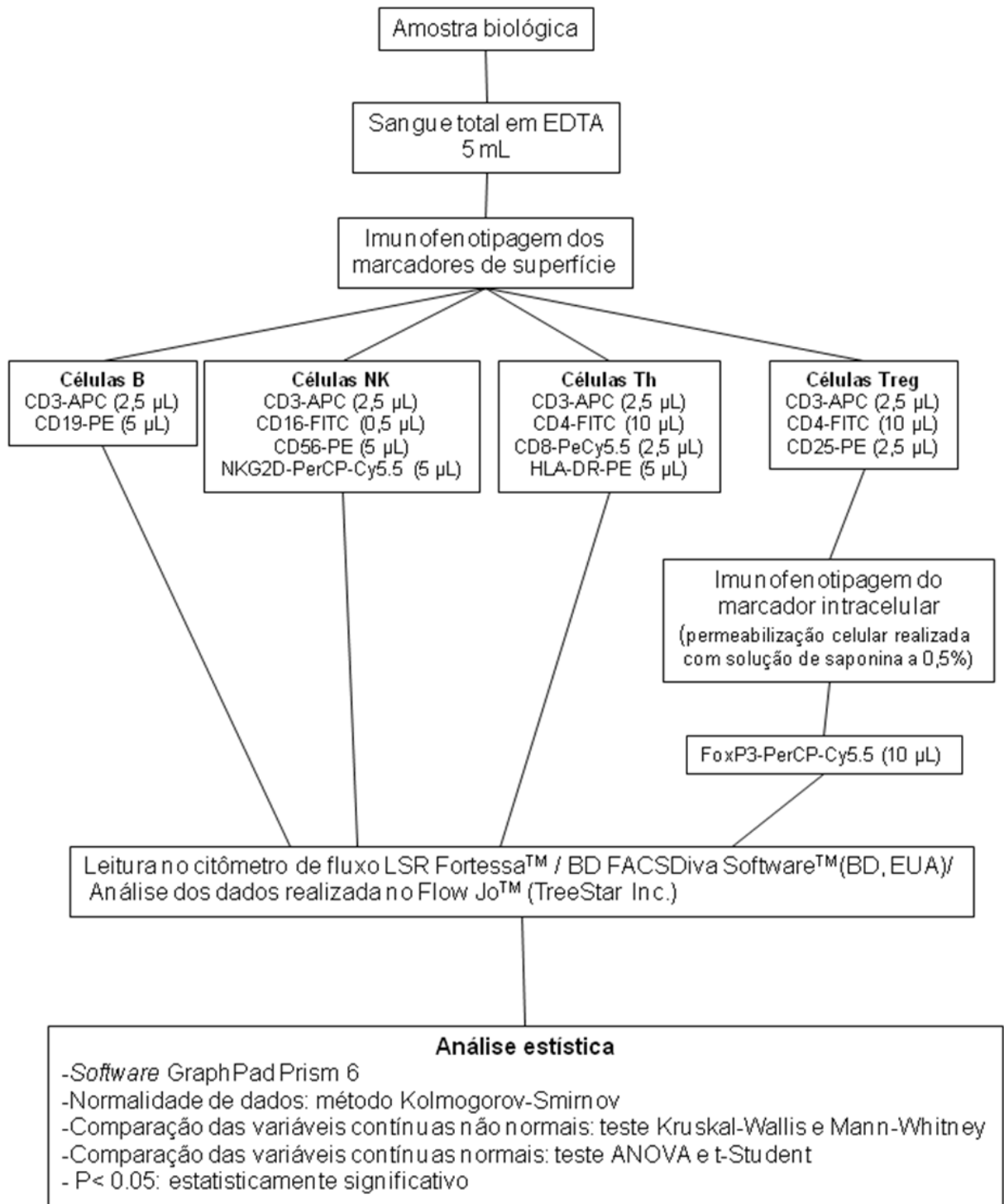
A coleta das amostras de sangue dos pacientes foi realizada no ambulatório de Reumatologia ou Hospital da Santa Casa durante a parte da manhã por meio de punção sanguínea venosa em fossa antecubital. Foram coletados 5 mL (1 tubo) de sangue com anticoagulante EDTA para análise do perfil imunofenotípico de células T (T reguladoras e T efectoras), B e NK. As amostras obtidas foram mantidas em temperatura ambiente (16°C a 28°C) até o momento da análise, que ocorreu em até 24 horas após a coleta do sangue conforme recomendações de STELZER *et al.*, 1997.

4.5 IMUNOFENOTIPAGEM

4.5.1 Análise *ex-vivo* do fenótipo celular de linfócitos

Em função do volume de amostra necessário para separação das células por meio do Histopaque[®], o ensaio de imunofenotipagem dos linfócitos do sangue periférico dos

pacientes foi realizado no contexto *ex-vivo*. As amostras biológicas dos pacientes e controles foram manipuladas e analisadas de acordo com o **Fluxograma 1**.



Fluxograma 1: Procedimentos realizados a partir da coleta das amostras até a análise estatística dos resultados.

Os volumes pré-titulados de anticorpos monoclonais foram adicionados a uma alíquota de 100 μ L de sangue total periférico. Para a marcação de células T foram adicionados os volumes de anticorpos de 2,5 μ L de CD3 (APC), 10,0 μ L de CD4 (FITC), 2,5 μ L de CD8 (Pe-Cy5.5) e 5,0 μ L de HLA-DR (PE) a um tubo já contendo o sangue total. Para marcação de células B foram adicionados a outro tubo, também contendo sangue total, os anticorpos nos volumes de 2,5 μ L de CD3 (APC) e 5 μ L de CD19 (PE). Para marcação de células NK foram utilizados os anticorpos nos volumes de 2,5 μ L de CD3 (APC), 0,5 μ L de CD16 (FITC), 5,0 μ L de CD56 (PE) e 5 μ L de NKG2D (PerCP-Cy5.5), enquanto para marcação de células T reguladoras foram adicionados os anticorpos nos volumes de 2,5 μ L de CD3 (APC), 10 μ L de CD4 (FITC), 2,5 μ L de CD25 (PE) e 10,0 μ L de FoxP3 (PerCP-Cy5.5). Após homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e protegidas da luz. Em seguida, foi realizada a hemólise das amostras, adicionando em cada tubo 2 mL de solução de lise comercial (FACS Lysing Solution-Becton Dickinson[®]) diluída 10 vezes em água destilada. As preparações foram incubadas por 10 minutos, a temperatura ambiente, protegidas da luz e então, submetidas à centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sedimento de leucócitos foi lavado em PBS-W. As células foram então fixadas com 200 μ L de solução fixadora (10g/L de paraformaldeído, 1% de cacodilato de sódio, 6,67g/L de cloreto de sódio, pH 7,4) até o momento da leitura em citômetro de fluxo. Após 10 minutos de fixação, os tubos utilizados para a marcação intracelular foram submetidos à centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos e novamente lavados em PBS-W para retirada do fixador. Para a detecção do marcador intranuclear FoxP3 foi utilizado protocolo descrito por Araujo *et al.*, 2007, que consistiu na adição de 1mL de solução de PBS-P (PBS, pH 7,4, contendo 0,5% de BSA, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina) para realizar a permeabilização das células. Posteriormente, os tubos foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, lavados em PBS-P e, após vertê-los, foram adicionados 10 μ L de anticorpos anti-FoxP3 para cada tubo. Após a incubação de 60 minutos, as células foram lavadas com 1mL de PBS-P e novamente lavadas, com 1mL de PBS-W. Para finalizar, foram adicionados 200 μ L da solução fixadora aos tubos contendo a suspensão celular e, então, procedeu-se à aquisição de dados em citômetro de fluxo. A expressão fenotípica nos leucócitos do sangue periférico foi identificada por meio da leitura no citômetro de fluxo LSR Fortessa[™] (BD, EUA) e a análise dos dados obtidos foi feita utilizando-se o *software* Flow Jo[™] (TreeStar Inc.).

4.5.2 Titulação dos marcadores de superfície celular

Os anticorpos utilizados nesse estudo podem ser observados na **Tabela 2**. Estes foram titulados em placa de microtitulação de 96 poços de fundo em U, cujo objetivo foi determinar o volume ideal de cada anticorpo para a análise dos fenótipos celulares. Inicialmente, o volume recomendado pelo fabricante para realização de um teste para cada anticorpo, foi adicionado a um poço da placa de 96 poços e esse volume foi completado com PBS-W (PBS, pH 7,4, contendo 0,5% de BSA e 0,1% de azida sódica) em quantidade suficiente para 100 μ L. Posteriormente, 50 μ L desses 100 μ L foram transferidos sucessivamente do primeiro poço até o oitavo e assim realizando a diluição seriada em poços que já continham 50 μ L de PBS-W. O volume final, 100 μ L, de anticorpo de cada poço foi adicionado à outra placa contendo em cada poço o sedimento de uma suspensão de células que foram previamente separadas por meio do uso de Histopaque[®] (Sigma-Aldrich[®]), de densidade 1,077 g/mL, tendo sido o número de células ajustado de 10^5 a 10^6 células/100 μ L de suspensão. As preparações foram incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente e protegidas da luz e então, submetidas à centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em PBS-W e então foram fixadas com paraformaldeído a 1%.

No caso do anticorpo FoxP3 não foi possível realizar a diluição seriada. Entretanto, foram testados volumes fixos do anticorpo de 20, 10 e 5 μ L.

O volume ideal de cada anticorpo necessário para a imunofenotipagem foi obtido após a leitura das suspensões de células marcadas com o respectivo anticorpo no citômetro de fluxo LSR Fortessa[™] (Biosciences Pharmingen, EUA) e a análise da determinação dos títulos foi realizada utilizando-se o software Flow Jo[™] (TreeStar Inc.) (**Anexo VIII**).

Tabela 2: Fenótipos e características dos respectivos anticorpos monoclonais marcados com os fluorocromos alofocianina (APC), isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), combinação entre ficoeritrina e cianina (Pe-Cy5.5) e combinação entre PerCP e cianina (PerCP-Cy5.5) do presente estudo.

Fenótipos	Anticorpo	Marca	Clone	Título
Células T	Anti-CD4-FITC	Dako	MT310	1:10
	Anti-CD8-PECy5.5	BD Biosciences	HIT8a	1:40
	Anti-CD3-APC	BD Biosciences	HIT3a	1:40
	Anti-HLADR-PE	BD Biosciences	G46-6	1:20
	Anti-FoxP3-PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	236a	1:10
	Anti-CD25-PE	BD Biosciences	M-A251	1:40
Células NK	Anti-NKG2D-PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	1D11	1:20
	Anti-CD56-PE	BD Biosciences	B159	1:20
	Anti-CD16-FITC	BD Biosciences	B73.1	1:160
Células B	Anti-CD19-PE	BD Biosciences	HIB19	1:20

4.6 AQUISIÇÃO DOS DADOS

Para cada amostra foram coletados no mínimo 100.000 eventos no citômetro de fluxo LSR Fortessa™ (BD, EUA) por meio do *software* do citômetro chamado BD FACSDiva Software™. A análise dos linfócitos obtidos a partir do sangue periférico foi realizada por meio de gráficos de distribuição de densidade de pontos de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC), selecionando a população de interesse (**Figura 3**). Ressalta-se que as outras populações de leucócitos já haviam sido excluídas mediante parâmetros definidos previamente.

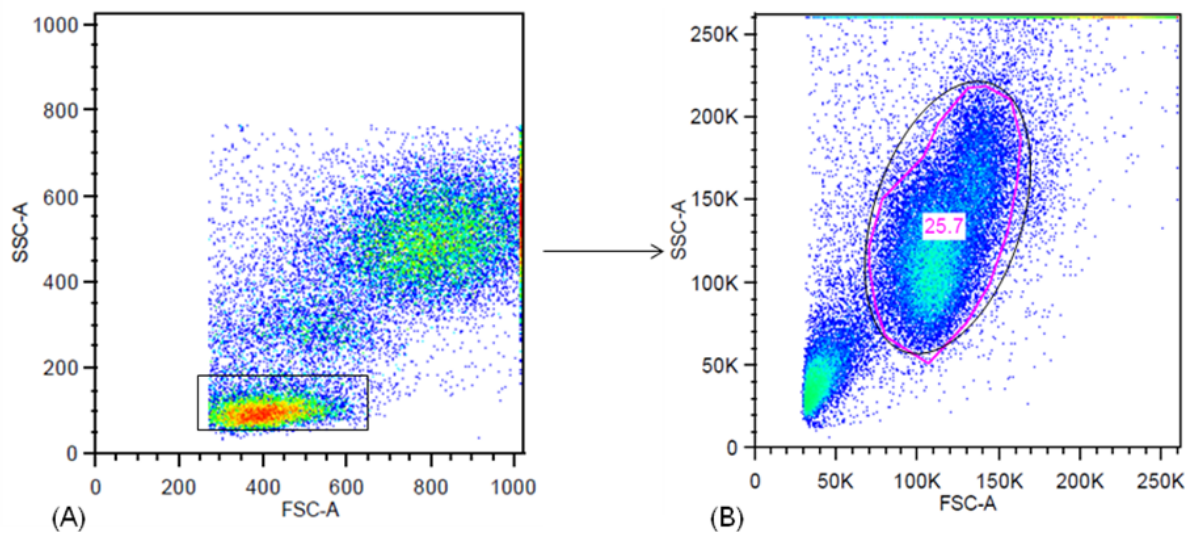


Figura 3: Gráfico de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) da população de linfócitos, no destaque, obtidas a partir da análise no Flow Jo™. (A) População de leucócitos com linfócitos em destaque, (B) população de linfócitos em destaque após exclusão de monócitos e granulócitos.

4.6.1 Análise convencional de linfócitos

A partir da seleção da população de linfócitos mostrada acima foram feitos os *dot-plots* e histogramas das populações celulares de interesse. As marcações podem ser visualizadas nas figuras abaixo (**Figuras 4, 5, 6, 7 e 8**).

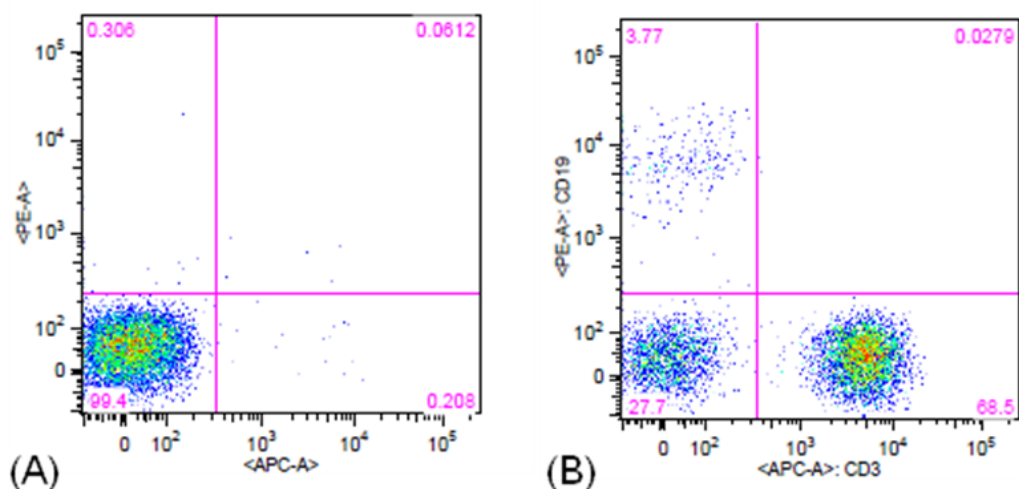


Figura 4: *Dot-plot* para avaliação de células B, APC *versus* PE. (A) Tubo controle sem marcação, (B) marcação de células B e T (CD19 e CD3).

Na análise das células Th e Treg foram selecionadas previamente as células CD3 positivas. Essas foram visualizadas em *dot-plot* CD3 versus SSC, conforme mostrado na **Figura 5**. Na **Figura 6** podem ser observadas células CD3 positivas sem marcação (controle) (A) e estas marcadas com CD4 e CD25 com população CD25^{high} e CD25^{int} (B), enquanto na **Figura 6C**, pode ser observado um histograma evidenciando a expressão do FoxP3 em células CD25^{high}.

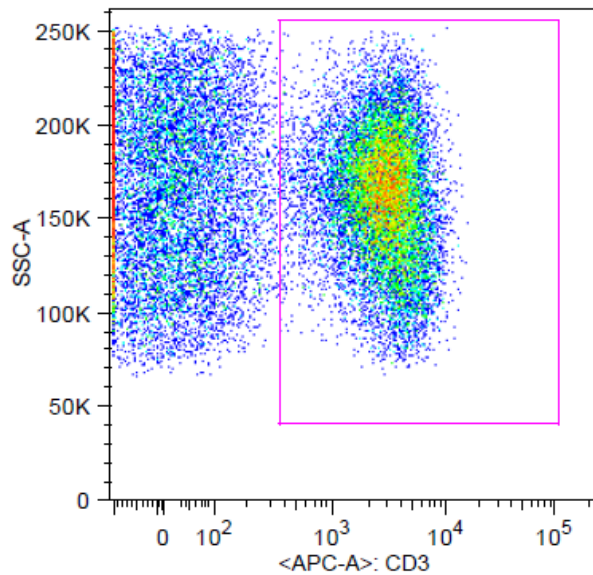


Figura 5: Gráfico de granulosidade (SSC) versus APC para evidenciar a marcação de células T (CD3).

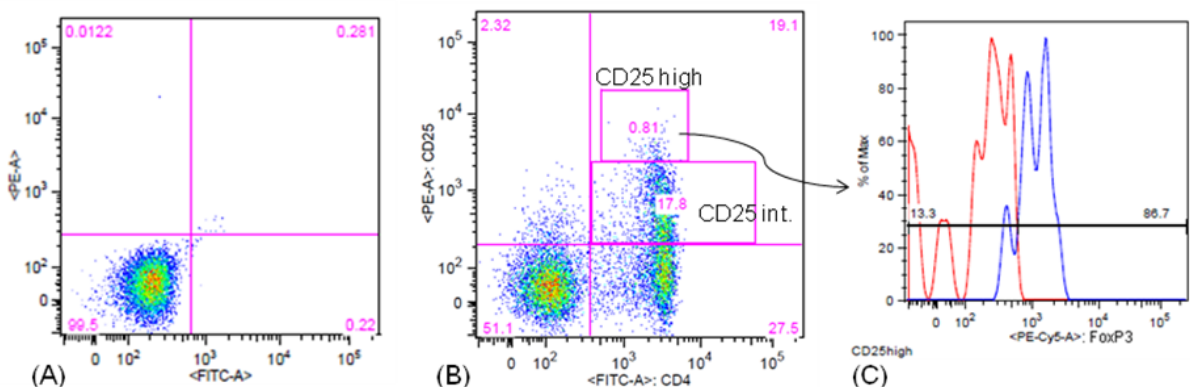


Figura 6: *Dot-plot* para avaliação de células T reguladoras, FITC versus PE, e histograma para avaliação do marcador FoxP3. (A) Tubo controle sem marcação, (B) marcação de células T reguladoras (CD3⁺CD4⁺CD25⁺) e a divisão entre população CD25^{high} e CD25^{int}, (C) histograma para avaliar a expressão de FoxP3 em células CD3⁺CD4⁺CD25^{high} indicada pela seta.

Na **Figura 7** podem ser observadas células CD3 positivas sem marcação (A) e estas marcadas com CD4 e CD8 (B), enquanto na **Figura 7C**, pode ser observada a marcação de células positivas para CD4 e HLA-DR e na **Figura 7D** pode ser observada a marcação de células positivas para CD8 e HLA-DR.

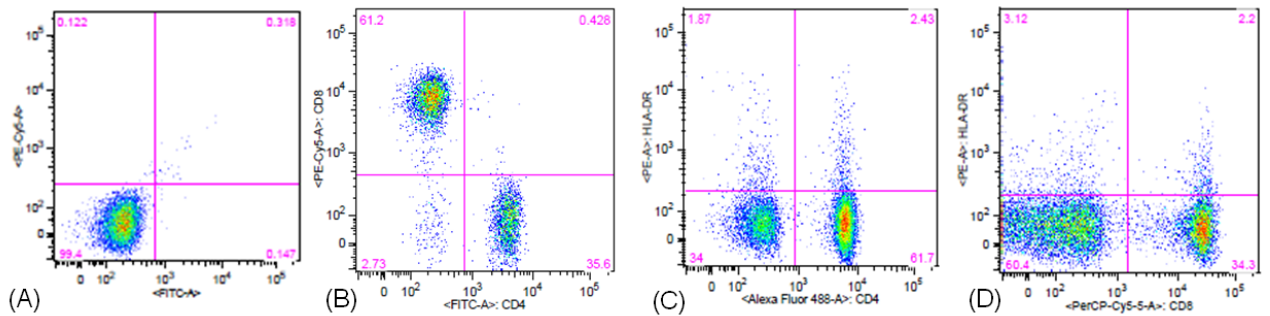


Figura 7: *Dot-plot* para avaliação de células T, FITC versus PEcy5.5, e HLA-DR em células T CD4⁺ e T CD8⁺. (A) Tubo controle sem marcação, (B) marcação de células T efetoras CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺, (C) avaliação da expressão de HLA-DR em células CD4⁺, (D) avaliação da expressão de HLA-DR em células CD8⁺.

Na análise das células NK foram estudadas quatro populações observadas no *dot-plot* CD3 versus CD56, entre essas, a população NK total (CD3⁻CD56⁺), as subpopulações NK *bright* (CD3⁻CD56^{bright}) e NK *dim* (CD3⁻CD56^{dim}), e a população NKt (CD3⁺CD56⁺). Para cada uma das quatro populações foi realizada a análise do NKG2D. Na **Figura 8**, observa-se o exemplo dessa análise para a avaliação da expressão de NKG2D na subpopulação de células NK *bright*.

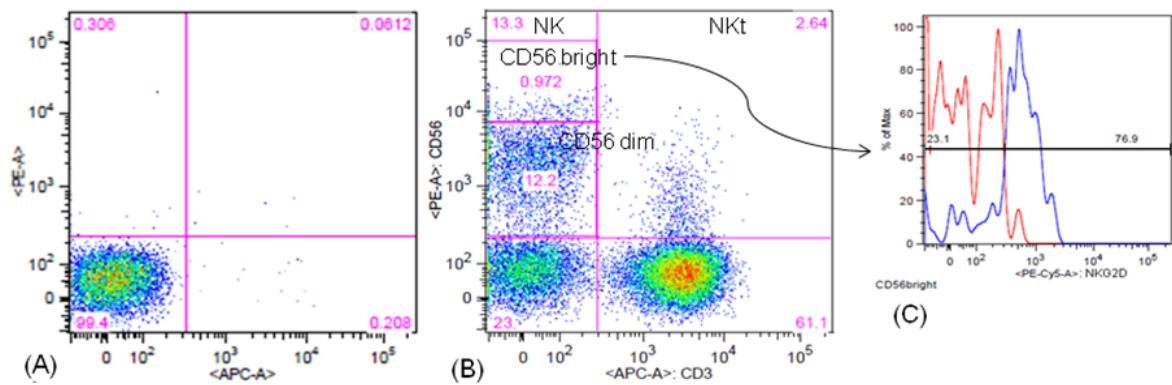


Figura 8: *Dot-plot* para avaliação de células NK, APC versus PE. (A) Tubo controle sem marcação, (B) marcação das células NK e suas subpopulações *bright* e *dim*, (C) histograma para avaliar a expressão de NKG2D nas células NK *bright* indicada pela seta.

Conforme recomendado por Herzenberg *et al.*, 2006, para avaliação da expressão percentual de FoxP3 e NKG2D foram utilizados tubos controles contendo todos os marcadores menos um. Por exemplo, para avaliação do FoxP3, os demais marcadores de superfície como CD3, CD4 e CD25 foram adicionados ao tubo, mas sem a presença do FoxP3. O mesmo foi realizado para as células NK em que foram adicionados ao tubo controle os anticorpos anti CD3, CD16, CD56, mas não o NKG2D. Para análise foi realizado o *overlay* entre as fluorescências do tubo com a marcação e sem a marcação conforme **Figura 9**. A avaliação da intensidade média de fluorescência (MFI) foi realizada por meio do cálculo do valor da mediana do fluorocromo de interesse de cada fenótipo estudado. Por exemplo, para determinar o MFI do marcador FoxP3 foi realizado o cálculo da mediana do fluorocromo PerCP-Cy5.5.

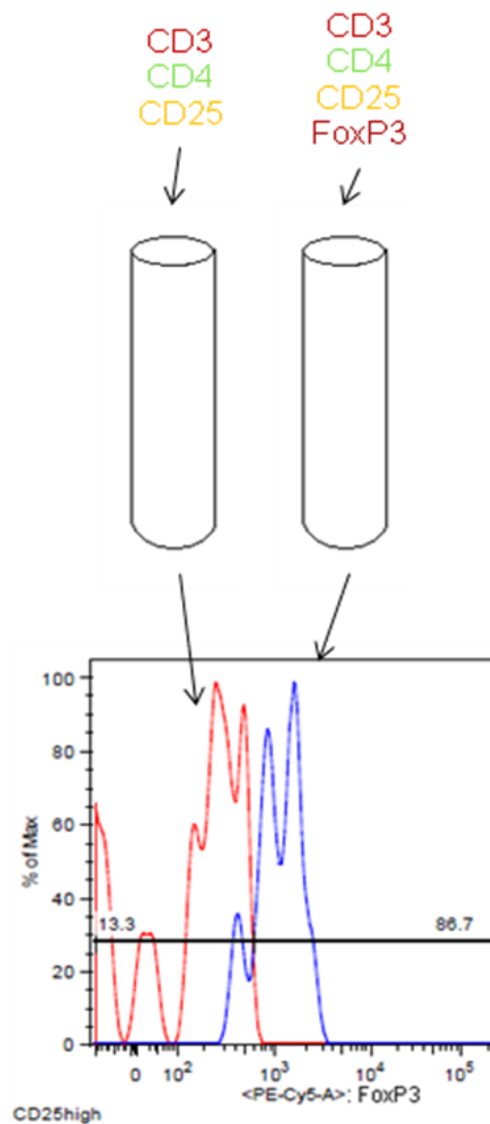


Figura 9: Estratégia de marcação e análise para avaliação dos marcadores NKG2D e FoxP3.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi efetuada ao término dos procedimentos experimentais utilizando-se o *software* GraphPad Prism 6TM, por meio do teste t – Student e da análise de Variância (ANOVA), em caso de dados com distribuição normal, para comparações entre dois e três grupos, respectivamente. No caso de dados com distribuição não normal, foram utilizados o teste de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis. A análise de normalidade

das variáveis foi avaliada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Quando os dados se mostraram normais, estes foram expressos como média e desvio padrão. Por outro lado, quando não normais, estes foram expressos como mediana, mínimo e máximo. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi inferior a 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

As características demográficas idade, sexo e SLEDAI-2K dos participantes deste estudo foram sumarizadas na **Tabela 1**, os quais foram distribuídos em grupos de pacientes portadores do LES na forma ativa (LES-A), na forma inativa (LES-I) e grupo controle (CN). Os dados laboratoriais de PCR, C3, C4, número de leucócitos e VHS dos pacientes com LES na forma ativa ou inativa podem ser observados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Dados laboratoriais dos pacientes com LES na forma ativa ou inativa.

Dados laboratoriais	LES-A (n=12)	LES-I (n=18)	P
PCR (mg/dL) (VR: < 0,30)	0,34 (0,10 a 7,80)	0,20 (0,10 a 12,0)	0,2893*
VHS (mm) (VR: 0 a 20)	37 (2 a 120)	21 (1 a 69)	0,4640*
C3 (mg/dL) (VR: 90 a 170)	86,91 (\pm 31,44)	107,2 (\pm 34,04)	0,1521**
C4 (mg/dL) (VR: 12 a 36)	17,10 (7 a 43)	24 (19 a 48)	0,0313*
Leucócitos (mm ³) (VR: 4000 a 11000)	5510 (3170 a 12700)	4640 (2730 a 10900)	0,5156*

*Mann-Whitney, **T-Student. LES-A: portadores de LES na forma ativa; LES-I: portadores de LES na forma inativa; PCR: proteína C reativa; VHS: velocidade de hemossedimentação; C3: fração do complemento C3; C4: fração do complemento C4; VR: valor de referência.

As características de cada paciente do estudo como idade, sexo, tratamento e resultado da biópsia renal estão sumarizados na **Tabela 4** e organizadas em ordem crescente do índice SLEDAI-2K.

Tabela 4: Principais características dos pacientes do estudo, incluindo idade, sexo, SLEDAI-2K, tratamento e resultado de biópsia renal quando disponível.

Paciente	Idade	Sexo	SLEDAI-2K	Tratamento	Resultado da biópsia renal
1	45	F	0	HCQ	-
2	33	F	0	PDN/HCQ	-
3	49	F	0	HCQ	-
4	69	F	0		-
5	29	F	0	HCQ / AZA	NL classe II
6	58	F	0	HCQ	-
7	31	F	0	PDN/HCQ / AZA	NL classe III
8	53	F	0	PDN/HCQ	-
9	29	M	1	PDN/AZA	NL classe III
10	31	F	1	PDN/AZA	NL classe IV
11	50	F	1	PDN/HCQ	-
12	42	F	2	PDN/AZA	NL classe IV
13	29	F	2	PDN/AZA	NL classe II
14	41	F	2	PDN/HCQ / AZA	NL classe III
15	20	F	2	PDN	-
16	40	F	4	PDN/AZA	NL classe III
17	24	F	4	PDN/HCQ	-
18	33	F	4	PDN/HCQ	NL classe II
19	34	F	6	PDN/HCQ/AZA	*
20	49	F	6	PDN/HCQ	-
21	21	F	8	PDN/HCQ	-
22	41	F	8	PDN/AZA	-
23	55	F	8	PDN	-
24	52	F	8	PDN/HCQ	-
25	21	F	10	PDN/HCQ	NL classe II
26	25	F	12	PDN/HCQ /MMF	NL classe III
27	18	F	14	PDN	-
28	24	F	16	PDN/HCQ/AZA	-
29	61	F	17	PDN/HCQ / AZA	-
30	18	M	18	PDN/HCQ /MTX	-

*Paciente com nefrite, porém sem a realização da biópsia renal. F: feminino; M: masculino; PDN: prednisona; HCQ: hidroxicloroquina; AZA: azatioprina; MMF: micofenolato de mofetil; MTX: metotrexato; NL: nefrite lúpica.

A análise dos prontuários dos pacientes com LES permitiu realizar o levantamento de quais foram os principais critérios diagnósticos da doença na população estudada. O critério/sintoma que apresentou maior frequência entre os participantes foi o resultado positivo de anticorpos antinucleares e, em seguida, artrite. A frequência dos critérios, segundo ACR, apresentados pelos pacientes pode ser observada na **Tabela 5**.

Tabela 5: Distribuição dos critérios de diagnóstico do LES de acordo com os acometimentos entre os portadores da doença.

Crítérios do LES	Número de pacientes total (%)	Número de pacientes LES-A	Número de pacientes LES-I
Anticorpos antinucleares (FAN-Hep2)	20 (66,7)	8	12
Artrite	13 (43,3)	5	8
Fotossensibilidade	12 (40,0)	6	6
Alterações hematológicas (total)	12 (40,0)	4	8
Linfopenia	6 (20,0)	1	5
Leucopenia	3 (10,0)	1	2
Plaquetopenia	2 (6,7)	1	1
Anemia hemolítica	1 (3,3)	1	0
Proteinúria	12 (40,0)	3	9
Eritema malar	11(36,7)	4	7
Alterações imunológicas (anti-DNA/anti-SM)	9 (30,0)	4	5
Úlceras orais/nasais	7 (23,3)	4	3
Convulsão ou psicose	4 (13,3)	1	3
Pleurite ou pericardite	4 (13,3)	1	3
Lesões cutâneas discóides	2 (6,7)	1	1

Os pacientes deste estudo que desenvolveram nefrite lúpica (NL) foram submetidos à biópsia para avaliação da extensão e gravidade da lesão renal. Quatro pacientes foram classificados como portadores de nefrite lúpica classe II, cinco pacientes como nefrite lúpica classe III e dois pacientes como nefrite lúpica classe IV segundo os critérios da OMS/ ISN/RPS (SOARES *et al.*, 2005).

5.2 FENÓTIPOS CELULARES

5.2.1 Células NK

Após a avaliação das populações foi realizada a análise das células NK. Não foram observadas diferenças significativas nos percentuais de células da população NK totais ($p= 0,891$; ANOVA), $CD3^+CD56^+$, e suas subpopulações, NK bright ($p= 0,915$; Kruskal-Wallis), NK dim ($p= 0,893$; ANOVA) e CD16 ($p= 0,474$; Kruskal-Wallis) quando comparados os grupos LES-A, LES-I e CN. Apenas a população NKt, $CD3^+CD56^+$, apresentou diferença significativa entre os três grupos ($p= 0,014$; Kruskal-Wallis). A análise do teste de Mann-Whitney para determinar a que grupo essa diferença estatística se refere mostra que o percentual de células NKt está diminuída no grupo de LES-A. Após aplicação do teste de Mann-Whitney, foi verificada diferença entre os grupos CN e LES-A ($p= 0,007$), e entre LES-A e LES-I ($p= 0,015$). Os menores valores para $CD3^+CD56^+$ foram observados no grupo com LES-A. O resultado pode ser observado na **Figura 10**.

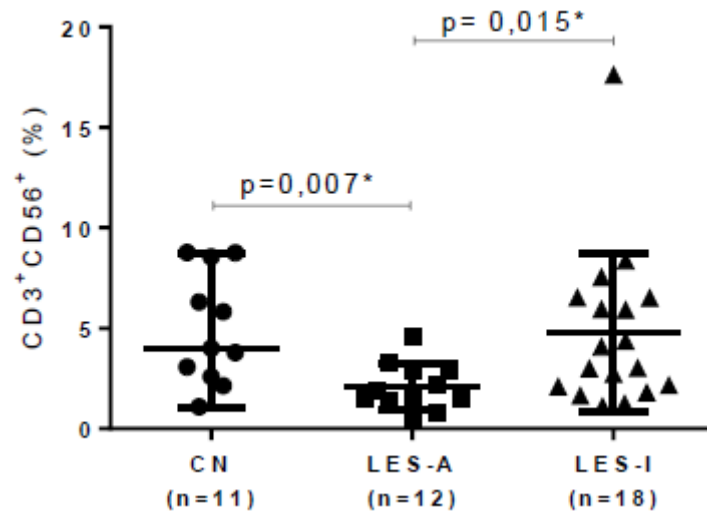


Figura 10: Expressão fenotípica de células CD3⁺CD56⁺(em percentual) para os grupos com a doença ativa (LES-A), inativa (LES-I) e grupo controle (CN). *Mann-Whitney.

Para avaliação da ativação das células NK foi utilizado o marcador de superfície NKG2D, porém nenhuma diferença foi observada entre os grupos LES-A, LES-I e CN para todas as subpopulações de células NK estudadas, CD3⁻CD56⁺ ($p= 0,259$; ANOVA), CD3⁺CD56⁺ ($p= 0,141$; ANOVA), CD3⁻CD56^{bright} ($p= 0,290$; Kruskal-Wallis) e CD3⁻CD56^{dim} ($p= 0,224$; ANOVA).

Na análise de intensidade média de fluorescência (MFI), foi observada diferença entre as populações de NK, CD3⁻CD56⁺ ($p= 0,049$; Kruskal-Wallis) e de Nkt, CD3⁺CD56⁺ ($p= 0,043$; Kruskal-Wallis) quando comparados os grupos com e sem nefrite lúpica e CN. A população com nefrite lúpica apresentou uma maior expressão de CD3⁻CD56⁺ quando comparada aquela sem nefrite lúpica. Similarmente o CD3⁺CD56⁺ se mostrou significativamente mais expresso nos pacientes com nefrite lúpica. Os resultados dessa análise podem ser observados na **Figura 11**. As diferenças foram observadas apenas entre as formas com nefrite e sem nefrite para os dois fenótipos.

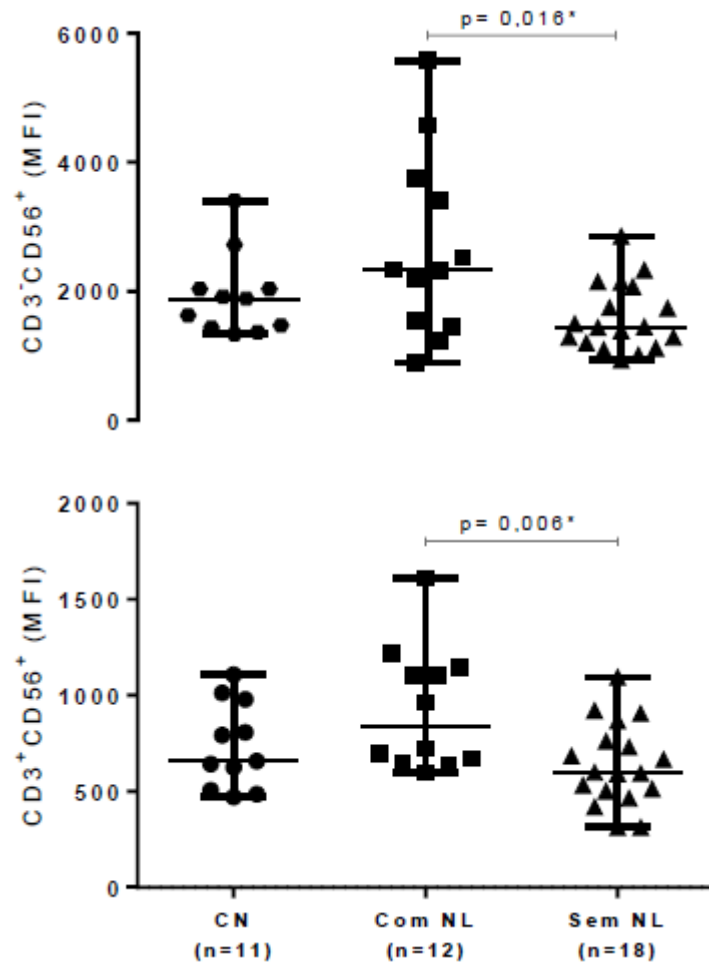


Figura 11: Expressão fenotípica das populações CD3⁻CD56⁺ e CD3⁺CD56⁺(em MFI) em pacientes com e sem nefrite lúpica (NL). *Mann-Whitney.

5.2.2 Células T efetoras

Após avaliação das populações foi realizada análise percentual de células T efetoras por meio da imunofenotipagem celular utilizando-se os marcadores de superfície CD3, CD4 e CD8. Para a análise do perfil de ativação celular foram utilizados o HLA-DR para análise de atividade tardia, e o CD25 para análise de atividade intermediária em células T CD4⁺.

Não foram observadas diferenças no percentual das populações de células T CD3⁺ entre os grupos CN, LES-A e LES-I (p= 0,300; Kruskal-Wallis). Quando foi realizada uma análise semelhante para T CD3⁺ em intensidade média de fluorescência (MFI) também

não foi observada diferença entre os grupos ($p= 0,056$; ANOVA). Da mesma forma, para o fenótipo $CD3^+CD4^-CD8^-$ também não foi observada diferença entre os mesmos grupos ($p= 0,936$; Kruskal-Wallis). Quando analisada a população de células T CD4 ($CD3^+CD4^+$) foram observadas diferenças quando comparados os grupos LES-A, LES-I e CN ($p= 0,014$; ANOVA). Ao contrário, para o perfil de ativação do HLA-DR das células T $CD4^+$, não foi observada diferença quando comparados os três grupos ($p= 0,273$; Kruskal-Wallis). Da mesma forma, e para o perfil de ativação do CD25, também não foi observada diferença ($p= 0,687$; Kruskal-Wallis). Já quando analisada a população de linfócitos T $CD8^+$ ($CD3^+CD8^+$) foram observadas diferenças quando comparados os grupos de LES-A, LES-I e CN ($p= 0,004$; ANOVA). Para a análise do perfil de ativação das células T $CD8^+$ foi utilizado o marcador de superfície para o HLA-DR e foi observada diferença entre os mesmos grupos ($p= 0,009$; Kruskal-Wallis). Nas populações em que se observaram diferenças foram realizadas análises entre as populações para determinar onde estas se encontravam por meio do teste de Mann-Whitney ou T-Student. Na **Figura 12** pode-se observar a distribuição dos valores obtidos, em percentual, para os grupos LES-A, LES-I e CN.

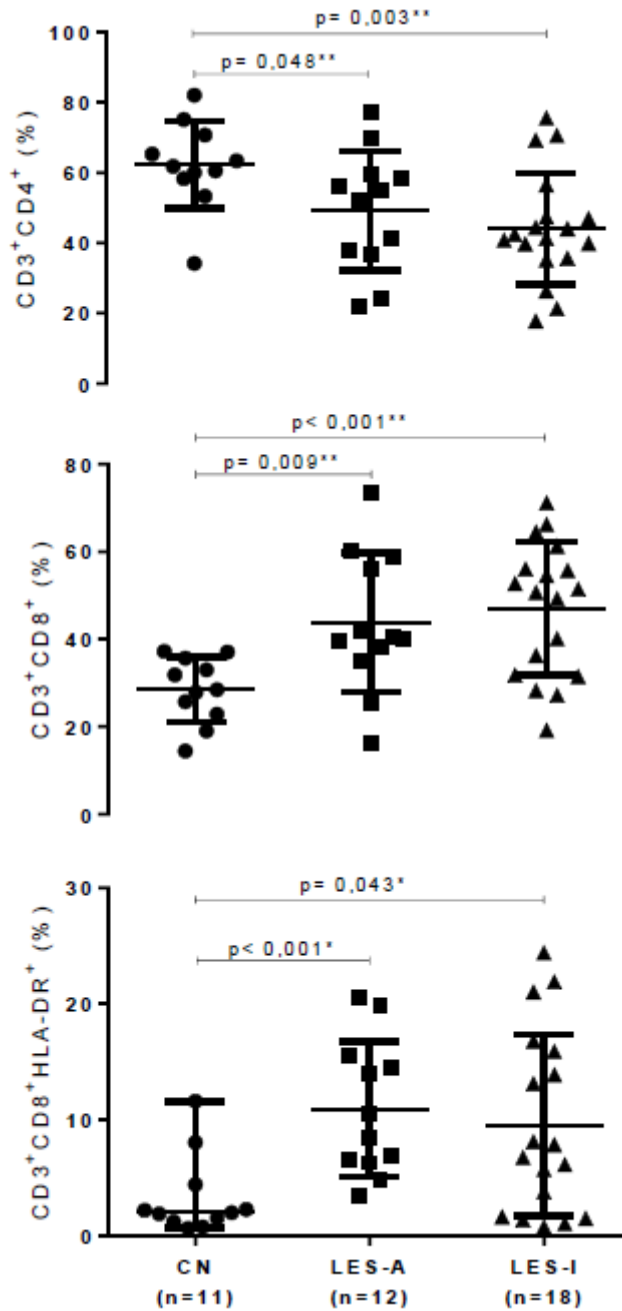


Figura 12: Expressão fenotípica (em percentual) das populações CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ e CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺ entre os grupos com a doença ativa (LES-A), inativa (LES-I) e grupo controle (CN). * Mann-Whitney; **T-Student.

Pela análise da **Figura 12**, pode-se observar uma diminuição no percentual de células T CD4⁺ circulantes nos pacientes com LES e um aumento no percentual de células T CD8⁺ que também apresentaram um perfil de ativação aumentado.

A mesma análise foi aplicada aos pacientes com e sem nefrite lúpica (NL) comparados ao grupo controle e os resultados foram similares aos anteriores. Nenhuma diferença para o percentual de células T CD4⁺ foi observada entre aqueles pacientes com e sem NL. Foi observada diferença para os pacientes com LES, com ou sem NL, comparados ao grupo controle. Este achado indica que as alterações nos perfis de células T CD4⁺, T CD8⁺ e HLA-DR se correlacionam ao LES de forma geral e não específica, como a renal. Os resultados podem ser observados na **Figura 13**.

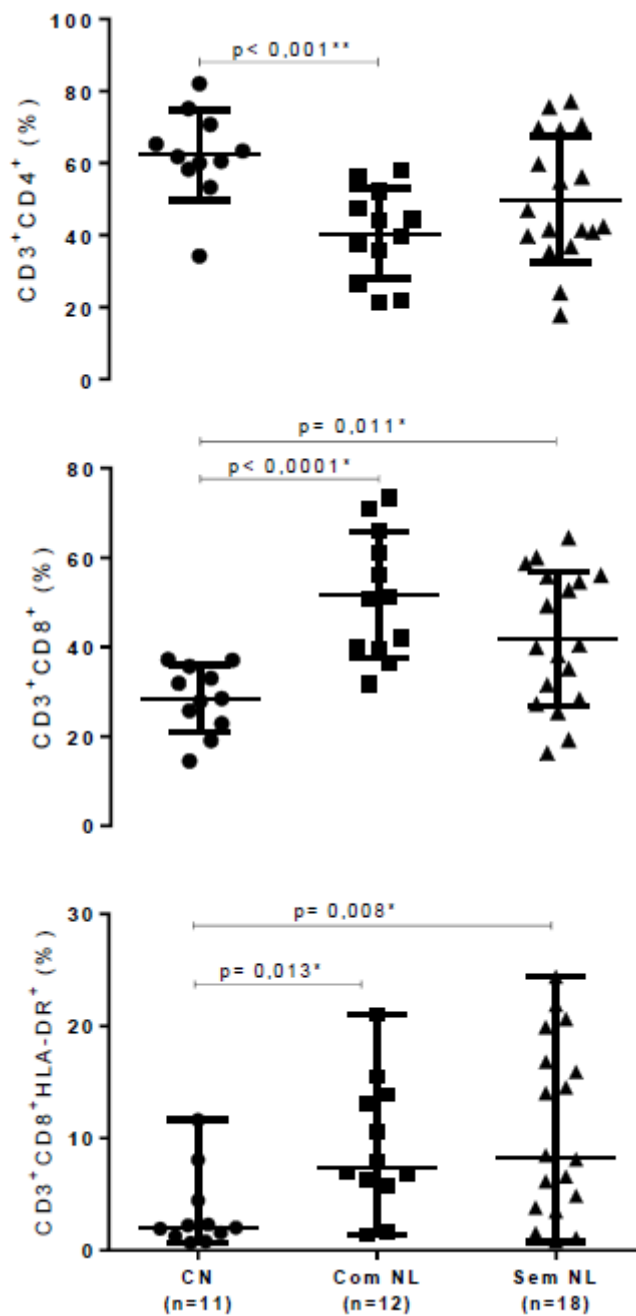


Figura 13: Expressão fenotípica (em percentual) das populações CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ e CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺ entre os grupos com e sem nefrite lúpica (NL) e grupo controle (CN). * Mann-Whitney; ** T-Student.

Por outro lado, foi observado um aumento da expressão, em MFI, de HLA-DR em células T CD4⁺ nos pacientes com nefrite lúpica (NL) em relação ao grupo CN (p= 0,004) e ao grupo sem NL (p= 0,039). Após análise, em MFI, da população CD3⁺CD56⁻NKG2D⁺ observou-se que a expressão de NKG2D em células CD3 está aumentada em pacientes

com NL em relação ao grupo controle ($p= 0,014$) e ao grupo sem NL ($p= 0,047$). Esses resultados podem ser observados na **Figura 14**.

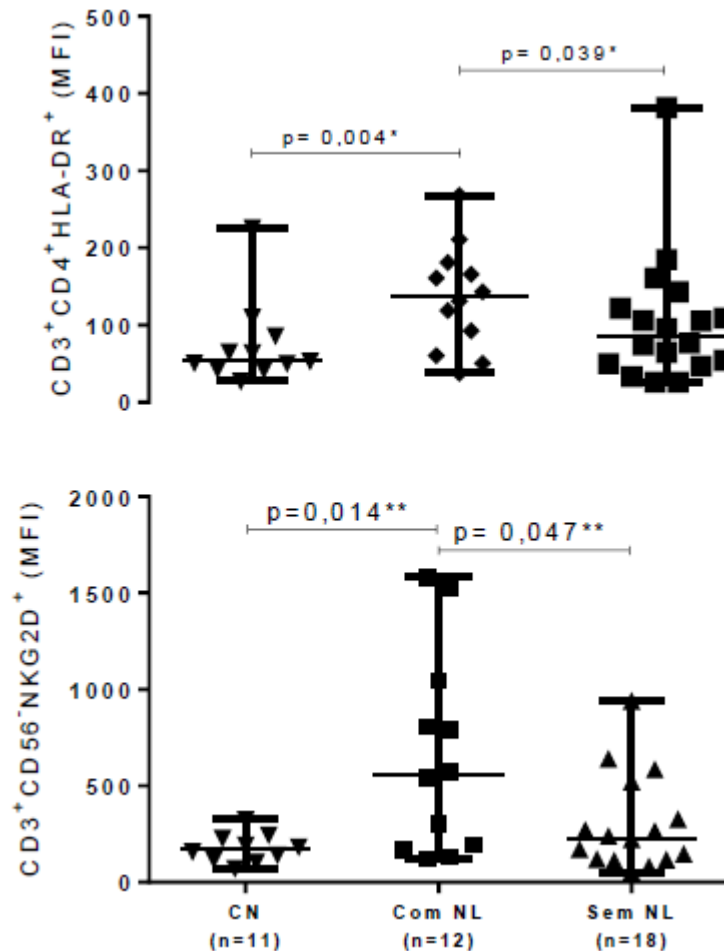


Figura 14: Expressão fenotípica (em MFI) das populações CD3⁺CD4⁺HLA-DR⁺ e CD3⁺CD56⁻NKG2D⁺ entre os grupos com e sem nefrite lúpica (NL) e grupo controle (CN).

*Mann-Whitney; ** T-Student.

5.2.3 Células T reguladoras

Após a avaliação das populações foi realizada análise de células T reguladoras utilizando-se os marcadores CD3, CD4, CD25 e FoxP3. Não foram observadas diferenças significativas para a população CD3⁺CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ entre os grupos LES-A, LES-I e CN ($p= 0,133$; ANOVA), porém, observou-se uma redução em percentual das CD3⁺CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ nos pacientes com LES-A *versus* CN ($p= 0,045$; T-

Student) quando os dados foram analisados em termos percentuais. No entanto, a análise, em MFI, da população $CD3^+CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ mostrou diferença significativa entre os grupos LES-A e CN ($p= 0,018$) e entre os grupos LES-I e CN ($p= 0,049$). Os resultados podem ser observados na **Figura 15**.

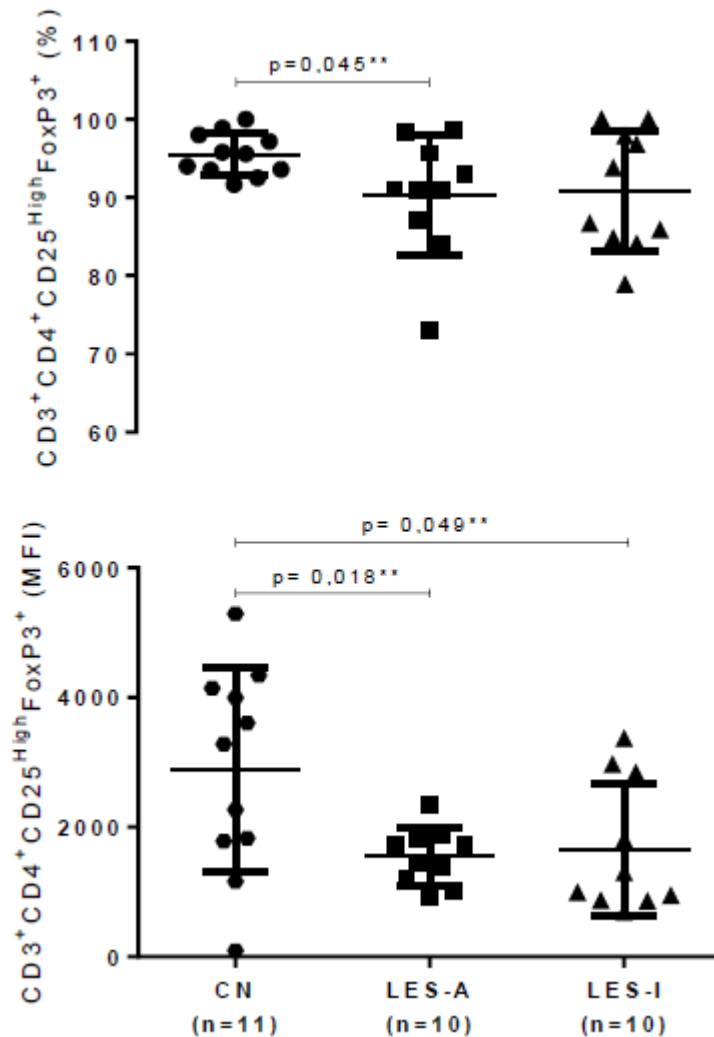


Figura 15: Expressão fenotípica (em percentual e em MFI) de células $CD3^+CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ entre os pacientes com as formas ativa (LES-A), inativa (LES-I) e grupo controle (CN). **T-Student.

Conforme mostrado na figura acima, foi observada uma menor expressão, em MFI, do FoxP3 nos pacientes com LES (ativo e inativo) em relação ao grupo CN. Entre os pacientes com e sem nefrite lúpica, em percentual (%) e em MFI, foi observada uma

redução significativa deste marcador apenas para a forma não renal da doença. O resultado obtido pelo teste T-Student pode ser observado na **Figura 16**.

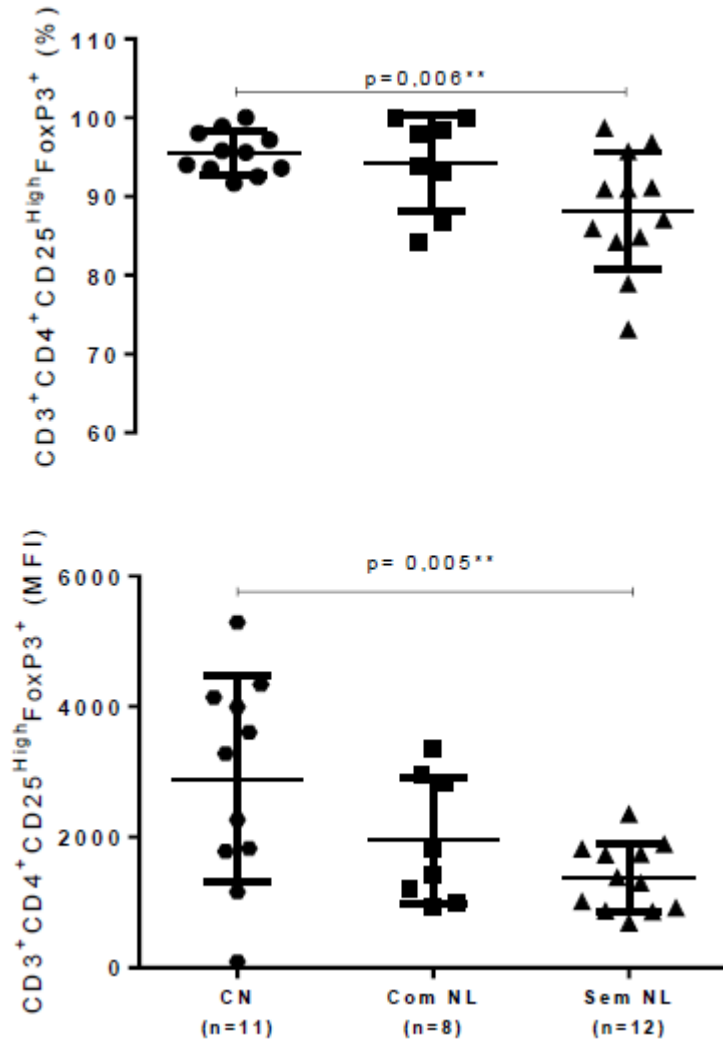


Figura 16: Expressão fenotípica (em percentual e em MFI) de células CD3⁺CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ de pacientes com e sem nefrite lúpica (NL) e grupo controle (CN). **T-Student

5.2.1 Células B

Após avaliação das populações foi realizada a análise estatística do percentual de células B, CD19⁺, para os grupos LES-A, LES-I e controle. Foi possível observar diferença significativa no percentual de expressão de células CD19 entre os grupos LES-A, LES-I e CN ($p = 0,001$; Kruskal-Wallis). Quando aplicado o teste de Mann-Whitney para

determinar quais os grupos eram diferentes entre si, observou-se que os resultados dos pacientes portadores de LES para CD19⁺ foram significativamente reduzidos em relação ao grupo controle, todavia não ocorrendo diferença entre LES-A e LES-I. O resultado da análise pode ser visualizado na **Figura 17**.

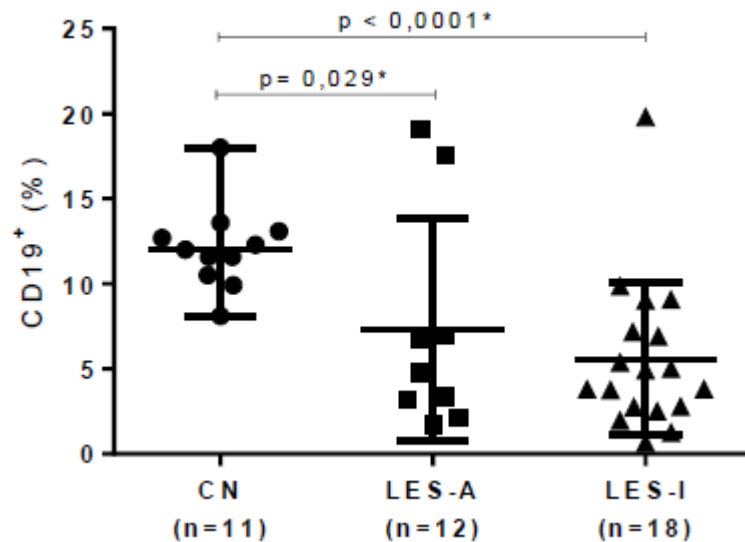


Figura 17: Expressão fenotípica (em percentual) de células CD19⁺ para os grupos com a doença ativa (LES-A), inativa (LES-I) e grupo controle (CN). *Mann-Whitney.

Foi também realizada a mesma estratégia de análise estatística para avaliação da população de células CD19⁺ em pacientes com e sem nefrite lúpica. A análise dos pacientes com nefrite lúpica não apresentou diferença em relação aos pacientes sem nefrite lúpica. Esse resultado indica que o percentual de células CD19⁺ está diminuído de forma geral nos pacientes com LES, não sendo, portanto, uma particularidade da nefrite lúpica. Os resultados podem ser observados na **Figura 18**.

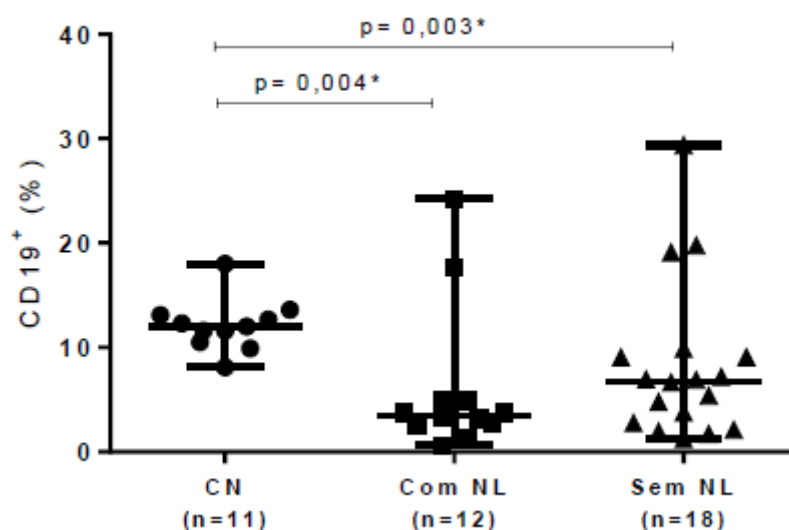


Figura 18: Expressão fenotípica (em percentual) de células CD19⁺ entre os grupos com e sem a nefrite lúpica (NL) e grupo controle (CN). *Mann-Whitney.

5.2.2 Tratamento dos pacientes

Como os pacientes estavam sob tratamento, este protocolo terapêutico foi analisado para investigar se os medicamentos com ação no sistema imunológico interferiram na expressão de algum fenótipo celular. Foram analisados os medicamentos utilizados pela maioria dos pacientes do estudo que são azatioprina, prednisona e hidroxicloroquina. A análise do efeito da azatioprina foi realizada em um grupo de 12 pacientes em uso desde medicamento, cujos resultados, em percentual, foram comparados aos 18 pacientes que não estavam em uso desse medicamento. Não foi observada diferença entre os resultados dos grupos em uso ou não de azatioprina para todos os fenótipos celulares estudados para células T, B e NK.

Para a investigação do efeito da prednisona na expressão dos fenótipos celulares, foram comparados dois grupos de pacientes. O primeiro formado por 8 pacientes com dose abaixo de 10mg e outro grupo formado por 17 pacientes com dose a partir de 10mg. Não foi possível formar um grupo de não usuário de prednisona devido ao número limitado de

pacientes. Também não foi observada diferença entre esses dois grupos quando comparados os resultados, em percentual, obtidos pela citometria de fluxo para os fenótipos celulares investigados.

Quanto aos possíveis efeitos da hidroxicloroquina sobre a expressão do fenótipo celular, foram comparados dois grupos, um formado de 20 pacientes em uso desse medicamento e 10 outros que não estavam em uso do mesmo. A comparação entre os resultados dos que usavam este medicamento *versus* os que não usavam mostrou diferença em percentual para as populações CD3⁻CD56⁺ como um todo ($p= 0,002$), e entre suas subpopulações CD3⁻CD56^{dim} ($p= 0,001$) e CD3⁻CD56^{bright} ($p= 0,012$), conforme **Figura 19**.

Os valores de p de cada fenótipo linfocitários da comparação entre os usos de prednisona, azatioprina e hidroxicloroquina podem ser visualizados no **Anexo VII**.

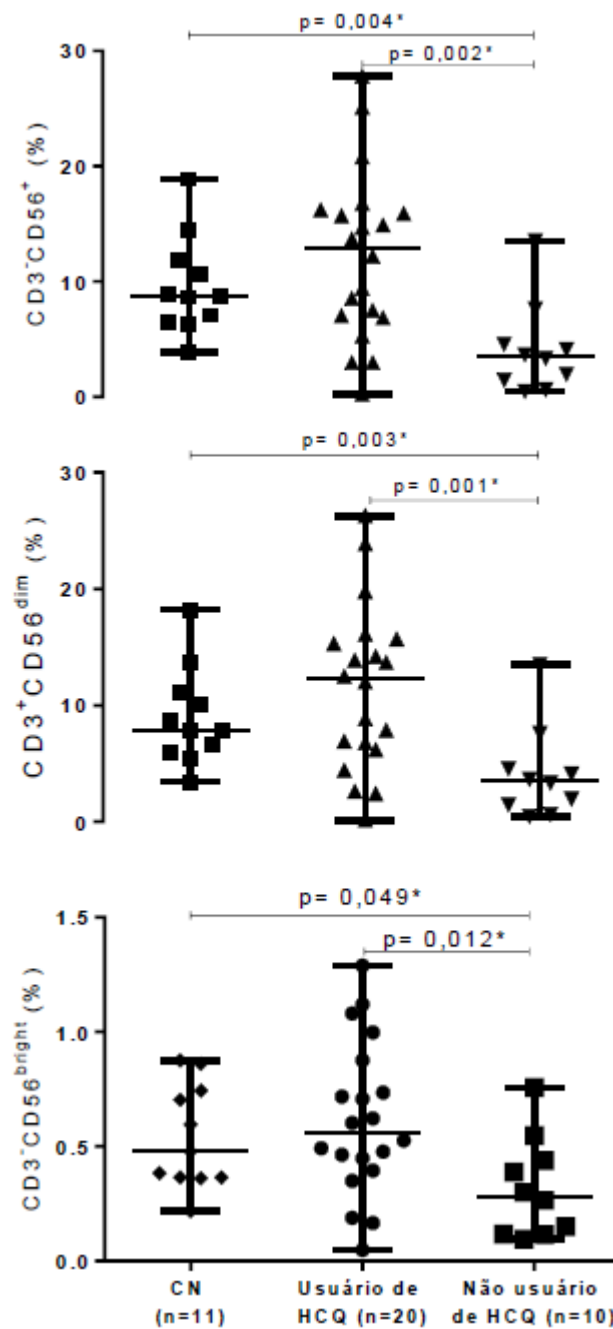


Figura 19: Expressão fenotípica de células CD3⁺CD56⁺, CD3⁺CD56^{dim}, CD3⁺CD56^{bright} (em percentual) entre usuários ou não de hidroxiclороquina (HCQ) e grupo controle (CN). *Mann-Whitney.

Um dos fenótipos de ativação em células NK, avaliado pela expressão de NKG2D, o CD3⁺CD56^{bright}NKG2D⁺ também apresentou diferença quando comparados os usuários e não usuários de hidroxiclороquina. O resultado pode ser visualizado na **Figura 20**.

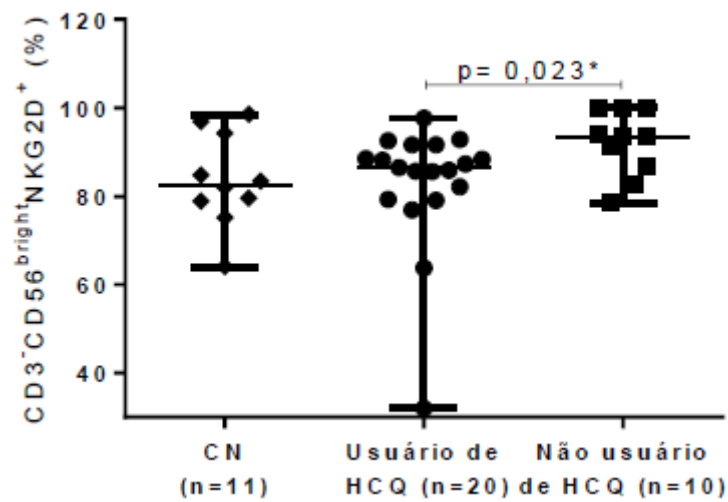


Figura 20: Expressão fenotípica (em percentual) da população CD3⁺CD56^{bright}NKG2D⁺ entre os grupos de usuários ou não de hidroxiclороquina (HCQ) e o grupo controle (CN).
*Mann-Whitney

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1 PACIENTES

Não foi observada diferença na idade entre grupos CN, LES-A e LES-I. Entre esses, registrou-se a participação de um indivíduo do sexo masculino em cada grupo. Quanto aos dados laboratoriais, os níveis de C4 foram significativamente mais baixos nos pacientes com a doença na forma ativa quando comparados àqueles observados nos pacientes com a forma inativa, porém os resultados para ambos os grupos não foram inferiores ao VR. O aumento da atividade do LES causa uma redução nas frações do complemento, C3 e C4, conforme reportado por Li *et al.*, 2013. Mesmo não observando diferença nos valores de C3 entre os grupos LES-A e LES-I, o grupo LES-A apresentou uma média discretamente mais baixa dessa fração, cujo resultado foi abaixo do VR. O grupo LES-A também apresentou valores mais altos para parâmetros inflamatórios, tais como PCR e VHS em relação ao grupo LES-I e ao VR. Os achados acima estão em consonância com a prática clínica em pacientes com LES.

Entre os pacientes com LES, foi observada que a presença de anticorpos antinucleares seguida de artrite, fotossensibilidade e alterações hematológicas foram os critérios diagnósticos observados com maior frequência. Tais achados foram similares aos observados por Schauen *et al.*, 2013, em pacientes de Porto Alegre, e por Borba *et al.*, 2013, em pacientes do estado de São Paulo, porém neste último a frequência do critério eritema malar foi maior que no presente estudo. Dentre os pacientes que foram submetidos à biópsia, a classificação como NL classe III foi a que apresentou maior frequência, porém a literatura indica que a classe mais comum é do tipo IV.

6.2 CÉLULAS NK

As células NK são um grupo heterogêneo de grandes linfócitos granulares que não expressam em sua membrana o CD3. Estas podem ser primariamente classificadas em

duas subpopulações dependendo da densidade de moléculas de CD56 expressas na membrana. A maior parte das células NK, aproximadamente 90%, possuem baixa expressão de CD56, CD56^{dim}, sendo responsáveis pela atividade citotóxica, enquanto que uma menor população que corresponde a aproximadamente 10%, CD56^{bright}, possui a função de secretar citocinas (COOPER *et al.*, 2001). Esse estudo não observou diferença no percentual total, ou suas subpopulações, de células NK circulantes entre pacientes com LES e o grupo controle. Esse achado difere dos resultados observados em outros estudos para essas populações os quais se mostraram diminuídos nos pacientes com LES (GREEN *et al.*, 2005, HENRIQUES *et al.*, 2013, HERVIER *et al.*, 2011). De acordo com GREEN *et al.*, 2005, um menor número de células NK circulantes foi observado e também com menor capacidade citotóxica. Park *et al.*, 2009, sugeriram que a deficiência das células NK no LES possa contribuir para as alterações observadas no sistema imune, 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. Observou-se na análise, em MFI, diferença na expressão de CD56 entre os pacientes com e sem NL, porém não foi observada diferença de ambos os grupos em relação ao controle. Em consonância com nossos dados, Park *et al.*, 2009, observaram que a deficiência do número de células NK circulantes e capacidade citotóxica foram mais proeminentes em pacientes com NL ou com trombocitopenia.

A avaliação do efeito do tratamento nas subpopulações de linfócitos mostrou que o uso de hidroxiquina pode alterar o percentual de células NK circulantes dos pacientes com LES em uso desse medicamento, aproximando o perfil destas células ao grupo controle (CN). Sacre *et al.*, 2012 demonstraram que a produção de IFN- α e TNF- α está diminuída em pacientes lúpicos tratados com hidroxiquina. O IFN- α possui um papel central na ativação de células do sistema inato, inclusive de células dendríticas e uma possível deficiência na ativação de células dendríticas poderia reduzir igualmente a produção de IFN- γ e IL-12 que são importantes na indução de células NK (SCHEPIS *et al.*, 2009). Diversos estudos apontam para uma interação entre células NK e células dendríticas (FERLAZZO *et al.*, 2004; LUCAS *et al.*, 2010). Existem relatos observados em células de cultura acerca de um maior perfil de ativação das células dendríticas de pacientes com LES, apesar de apresentarem um menor número de células circulantes no

sangue desses pacientes. No entanto, a migração das células dendríticas para os tecidos pode ser uma provável causa para a diminuição no número dessas células na circulação (RÖNNBLÖM *et al.*, 2006). Em modelos murinos, foi observado que as células dendríticas participam da ativação das células NK e estimulam a migração dessas para os tecidos (LUCAS *et al.*, 2007; LUCAS *et al.*, 2010). Essa é uma possível explicação para um maior número de células NK circulantes observado nesse estudo em pacientes em uso de hidroxicloroquina.

Não foram observadas diferenças no percentual de NKG2D entre os pacientes com LES e o grupo controle na análise do perfil de ativação das células NK. Esse resultado está de acordo com o obtido por Hervier *et al.*, 2011, porém contrasta com o apresentado por Li *et al.*, 2010 que observaram uma expressão diminuída desse marcador em células NK de pacientes com LES. De acordo com Orange *et al.*, 2006, a citotoxicidade das células NK depende da presença de citocinas envolvidas no microambiente e das interações entre outras células do sistema imune como as células dendríticas que promovem maturação e ativação de células NK e liberação de IFN- γ . Portanto, as discrepâncias entre os resultados dos estudos poderiam ser explicadas por diferenças entre tratamentos e perfis dos pacientes participantes com LES (HERVIER *et al.*, 2011). Tais diferenças poderiam explicar, pelo menos parcialmente, o resultado obtido para o marcador NKG2D entre as populações de NK dos usuários ou não de hidroxicloroquina. Porém não foi observada diferença desse marcador entre os pacientes com LES (usuários ou não de hidroxicloroquina) e o grupo controle.

6.3 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. Nesse estudo, foi observada uma diminuição no número circulante dessas células entre os pacientes com a forma ativa da doença. Segundo Ricciari *et al.*, 2000, essa população está diminuída em pacientes com LES, porém a influência que o tratamento pode causar no número dessas células não pode ser determinada. No presente estudo não foi observada influência do tratamento com prednisona, azatioprina e hidroxicloroquina sobre a população de NKt

dos pacientes em uso destes medicamentos. Na análise, em MFI, foi observada diferença na expressão do CD56 nas células NKt entre os pacientes com e sem NL, porém não foi observada diferença de ambos os grupos em relação ao controle. As células CD3⁺CD56⁺ constituem uma população heterogênea consistindo de células CD4, CD8, duplo negativa ou duplo positiva (GREEN *et al.*, 2007), apresentando um número limitado de receptores de células T que reconhecem moléculas de lipídios e glicolipídios. Quando ativadas essas células produzem citocinas pró-inflamatórias e degranulam granzimas ou outros componentes citotóxicos (GUO *et al.*, 2012). Cho *et al.*, 2011, 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. Esses resultados estão em concordância com os achados do presente estudo que, apesar de um número limitado de amostras investigadas, encontrou também níveis significativamente reduzidos de células NKt em pacientes apresentando a forma ativa da doença (LES-A). No entanto, no nosso estudo pacientes com a forma inativa (LES-I) não apresentaram redução de células NKt em relação ao grupo controle. Este achado vem adicionar importância à avaliação das células NKt em pacientes com LES como ferramenta preditora da atividade da doença. Todavia, cabe ressaltar que poucos pacientes com a forma ativa foram avaliados (n=12), o que sem dúvida preclui uma conclusão definitiva sobre o real papel destas células. Além do mais, as células NKt apresentam várias subpopulações e seria desejável que outras marcações tivessem sido feitas para a elucidação de qual componente celular está intrinsecamente associado à atividade da doença. Portanto, estudos adicionais poderiam trazer novos *insights* sobre as diversas subpopulações das células NKt e sua relação com o LES ativo. Entre a população de células NKt há 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 (MAJOR *et al.*, 2006). A redução dessa população também está associada a uma maior produção de IgG e anti-DNA dupla-fita o que indica a participação dessas células no estímulo de células B levando a uma maior produção de anticorpos (CHUANG *et al.*, 2012).

Células NKt podem ser ativadas através de receptores de ativação expressos na membrana como NKG2D e os receptores de citotoxicidade como o NKp30, NKp44, NKp46

(GUO *et al.*, 2012). Nosso estudo avaliou a expressão de NKG2D e não foi observado diferença desse marcador nas células NKt em pacientes com LES.

6.4 CÉLULAS T EFETORAS

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. No presente estudo, foi observada uma diminuição no percentual de linfócitos T CD4⁺ nos grupos LES-A e LES-I em relação ao controle e este resultado está de acordo com estudos prévios (PATSCHEAN *et al.*, 2006; WOUNTERS *et al.*, 2004). 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 (DACA *et al.*, 2011). Estudos realizados em humanos e em modelos murinos do lúpus indicam que a produção de anticorpos por células B autoreativas é promovida com a ajuda de células T CD4⁺ (SHIN *et al.*, 2011). Nem todas as células T CD4⁺ são do tipo auxiliar (*helper*) e 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. No presente estudo, não foi observado um aumento no perfil de atividade intermediária ou tardia de células T CD4⁺, analisada por meio dos marcadores de superfície CD25^{int} e HLA-DR, entre os grupos de pacientes e controle. Esse resultado está de acordo com o encontrado por Daca *et al.*, 2011, porém este autor observou que a escolha do índice para determinar a atividade da doença pode influenciar nos resultados devido a diferenças entre os índices. Por exemplo, o índice SLAM leva em consideração a gravidade no acometimento dos órgãos, o que não é observado no SLEDAI-2K. O LES é uma doença autoimune consequente a ativação crônica do sistema imune, portanto era esperado que mais células expressassem marcadores de atividade tardia como o HLA-DR. Porém, a expressão de CD69, marcador dos estágios iniciais de ativação, ou o CD25^{int}, marcador intermediário, ocorre apenas nos estágios iniciais da doença ativa e não são cronicamente expressos na superfície de células T (BIJL *et al.*, 2001; DACA *et al.*, 2011). Já na análise, em MFI, foi observada uma maior expressão do HLA-DR em células do tipo T CD4⁺ em pacientes portadores de NL indicando uma atividade crônica dessas células.

No presente estudo foi observado que o percentual e ativação de células T CD8⁺ se encontram aumentados nos pacientes com LES em relação ao controle. Esses achados estão de acordo com outros estudos publicados (BIJL *et al.*, 2001; WOUNTERS *et al.*, 2004), e apesar do importante papel dessa população na defesa contra agentes virais, o papel das células T CD8⁺ não está claro no LES (CRISPIN *et al.*, 2010). 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⁺. Esse aumento da atividade das células T CD8⁺ está relacionado ao aumento da atividade da doença, e pode ser uma das causas da produção de autoantígenos. O mecanismo que leva a 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 (BLANCO *et al.*, 2005).

Em pessoas saudáveis, uma pequena fração das células T do sangue periférico não expressam CD4 ou CD8 (duplo negativo). A origem ou função dessas células ainda é pobremente conhecida (CRISPIN *et al.*, 2009). Sieling *et al.*, 2000, descreveram um aumento dessa população nos pacientes com LES, e sabe-se que essa população produz IL-4, induz à produção de imunoglobulinas em células B e anticorpo anti-DNA dupla-fita. Segundo Crispin *et al.*, 2008, essa população também produz altos níveis de IL-17, uma poderosa citocina pró-inflamatória que promove a infiltração de células polimorfonucleares em rins de pacientes com nefrite lúpica. Nas amostras analisadas no presente estudo, não foi possível observar diferença entre a população de pacientes com LES e controle, possivelmente em função do número limitado de amostras analisadas. As células T CD3⁺ que não expressam CD4 ou CD8 podem ser células T CD8⁺ que deixaram de expressar as moléculas de superfície CD8 (CRISPIN *et al.*, 2009). Dos fenótipos avaliados no presente estudo, foi observado um aumento na expressão de NKG2D em células T CD3⁺CD56⁻ de amostras de pacientes com NL. Esse marcador é expresso em células NK, mas também pode ser encontrado em células CD8⁺ e exercer um papel na ativação dessas células em conjunto com sinais de ativação adicionais. Em modelos murinos de diabetes tipo I foi observado o papel de células CD8⁺NKG2D⁺ na lesão de células do pâncreas (STIEGERWALD *et al.*, 2009).

6.5 CÉLULAS T REGULADORAS

Células T reguladoras constituem uma linhagem de células T que expressam o fator de transcrição FoxP3. Possuem a capacidade de inibir a resposta de células T autorreativas e previnem respostas imunes exuberantes dirigidas contra antígenos externos (SATAKE *et al.*, 2013). Apenas células com uma alta expressão de CD25 demonstraram uma ação regulatória potente e são selecionadas na citometria de fluxo para caracterizar células T reguladoras. No presente estudo, estas foram caracterizadas como sendo a população que expressa a marcação $CD3^+CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ e seu percentual foi significativamente menor no sangue periférico de pacientes com a forma ativa da doença. A análise, tanto em MFI como em percentual, mostrou uma expressão de FoxP3 significativamente diminuída nos pacientes com LES-A em relação ao controle. Todavia, quando se compararam os resultados da expressão fenotípica de células $CD3^+CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ de pacientes com e sem NL, foi observada diferença significativa apenas entre os pacientes com LES sem NL e grupo controle, sendo que os primeiros apresentaram valores significativamente menores. Os estudos das células T reguladoras circulantes são divergentes quanto à diminuição do número e função nos pacientes com LES (KLECZYNSKA *et al.*, 2011). A diminuição das células T reguladoras favorece o descontrole e a progressão de doenças autoimunes como o LES. A maioria dos estudos mostra uma diminuição no número ou na função dessas células (CRISPIN *et al.*, 2003, BARATH *et al.*, 2007), porém alguns estudos não chegaram a esse resultado como o de Dolff *et al.*, 2011. Provavelmente 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. 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. 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 (XING *et al.*, 2012). Porém, quando a ação do TGF- β está em conjunto com IL-2 há um favorecimento para a manutenção e proliferação das células Treg (KLECZYNSKA *et al.*, 2011; SATAKE *et al.*, 2013).

6.1 CÉLULAS B

O resultado obtido para expressão de CD19 em sangue periférico de pacientes com LES na forma ativa ou inativa foi menor que o encontrado no grupo controle, e está de acordo com os achados da literatura (CHANG *et al.*, 2008; DOLFF *et al.*, 2007). O LES é conhecido como uma doença em que as células B produzem autoanticorpos de forma espontânea. Apesar de uma baixa expressão de CD19 e a possível linfopenia que ocorre na doença, diversos autores descrevem um aumento da população de células B imaturas ou transicionais, células B de memória, plasmablastos e plasmócitos circulantes que espontaneamente produzem esses anticorpos (MOK, 2010; LOONEY *et al.*, 2004).

Um maior conhecimento do papel das células B nas respostas imunes como secretoras de anticorpos e como apresentadoras de antígenos resultaram no interesse de desenvolver novas terapias nas doenças autoimunes tendo estas células como alvo. Uma estratégia desenvolvida nesse sentido foi o desenvolvimento de anticorpos monoclonais dirigidos contra componentes da imunidade humoral. O primeiro medicamento aprovado pelo FDA para o tratamento de artrite reumatoide foi o anticorpo anti-CD20, rituximab, que em pacientes com LES não conseguiu cumprir o objetivo clínico primário, ou seja, não demonstrou resultado superior ao placebo no tratamento desta doença. No entanto, em 2011, foi aprovado pelo FDA o belimumab, que consiste em um anticorpo monoclonal inibidor do fator de sobrevivência das células B (BLys, *B lymphocyte stimulator*). Em estudos clínicos de fase III esse anticorpo diminuiu consideravelmente a atividade da doença, a necessidade de uso de corticosteroide e a ocorrência de *flares* nos pacientes (SANZ *et al.*, 2010).

O presente estudo buscou diferenças fenotípicas entre as formas ativa e inativa do LES. Dentre os parâmetros investigados, as células NKT constituíram o único parâmetro significativamente diferente entre as formas ativa e inativa desta doença, sugerindo que a avaliação destas células possam ter um papel importante no acompanhamento desta complexa doença. Portanto, esses achados preliminares devem nortear o delineamento de novos estudos que contemplem um número maior de pacientes e que permitam estudar a relação entre as subpopulações das células NKT e a atividade da doença.

6.2 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Apesar de muito rigor na execução dos procedimentos técnicos, incluindo cuidados em relação à coleta do sangue, manuseio da amostra, obtenção e marcação das células, além de cuidados também na seleção dos pacientes pelos membros da equipe médica da Santa Casa de Belo Horizonte, o presente estudo apresentou algumas limitações que devem ser consideradas. Primeiramente, os dados laboratoriais foram obtidos por meio de análise de prontuários e não por meio de exames realizados nas amostras de sangue utilizadas na imunofenotipagem. Dessa forma, não foi possível comparar os dados laboratoriais aos fenótipos obtidos neste estudo.

Cumpramos ressaltar também que os pacientes que participaram desse estudo estavam sob tratamento. Dessa forma, é possível que o resultado de algum fenótipo tenha sofrido alguma interferência da ação de algum medicamento. No presente estudo, tentou-se avaliar se isso de fato ocorreu, porém não foi possível avaliar o efeito de algum medicamento de forma isolada. Não foi realizada também a avaliação da possível interferência de outras classes terapêuticas que não apresentam ação conhecida no sistema imune tais como os hipoglicemiantes, estatinas, anticoagulantes e anti-hipertensivos.

Um outro fator limitante foi não ter sido realizada avaliação clínica dos participantes do grupo controle, tendo sido a inclusão destes apenas por meio do auto relato da condição clínica e da exclusão de medicamentos com potencialidade de afetar o sistema imune, bem como de histórico familiar do LES.

Finalmente, deve-se mencionar as limitações inerentes ao índice SLEDAI-2K, o qual constituiu a ferramenta avaliadora da atividade da doença nos pacientes que integraram o presente estudo. Todavia, a literatura específica reporta variações do *cut off* para a

determinação da atividade da doença. Também, concomitantemente, poderiam ser utilizados outros índices como o SLAM ou o BILAG para avaliar melhor o comprometimento de órgãos.

Este estudo contribui para se obter um maior conhecimento acerca da patogênese do LES em nosso meio, permitindo confirmar algumas alterações do sistema imune já evidenciadas em outras partes do mundo, alterações essas importantes para nortear estratégias de controle e desenvolvimento de novos tratamentos que eventualmente venham oferecer uma resposta mais eficaz e menos heterogênea por parte da população alvo. Novas ferramentas preditoras do agravamento da doença também merecem ser pesquisadas e se revestem de suma importância na adoção de medidas precoces.

No entanto, nem todos os dados obtidos no presente trabalho são concordantes com a literatura, o que pode ser justificado pelo número limitado de amostras ensaiadas ou por diferentes fatores ambientais, genéticos e epigenéticos, além de possíveis infecções subclínicas, considerando que o desenvolvimento de doenças autoimunes pode ser influenciado pela combinação de todos estes fatores.

Os dados obtidos na presente investigação abrem perspectivas para se explorar outros importantes aspectos nos pacientes em estudo, tais como o perfil de citocinas e sua correlação com os fenótipos celulares obtidos, o que contribuiria para uma melhor caracterização do tipo de resposta efetora das células T de pacientes com LES, sob tratamento, provenientes do Centro de Especialidades Médicas da Santa Casa de Belo Horizonte.

7 CONCLUSÃO

1. As populações de linfócitos NK, T, B apresentaram diferenças nos fenótipos celulares, em pacientes com LES em tratamento, cuja doença está em atividade comparada com aquela sob controle, a saber:

- A população de células NKt se mostrou diminuída apenas em pacientes com a forma ativa da doença, enquanto as populações de células efetoras T CD4⁺, T reguladoras FoxP3⁺ e de células B se mostraram diminuídas em pacientes com LES, em ambas as formas ativa e inativa, quando comparado ao grupo controle. Ao contrário, a população de células T CD8⁺ se mostrou elevada no grupo com LES, nas formas ativa e inativa, inclusive em seu estado de ativação, demonstrado pela maior expressão do HLA-DR.

2. As populações de linfócitos NK, T, B apresentaram diferenças nos fenótipos celulares, em pacientes com LES em tratamento, com ou sem nefrite lúpica, a saber:

- Um aumento na expressão do marcador de atividade NKG2D em pacientes com nefrite lúpica em relação aos sem nefrite lúpica;

- As populações de células efetoras T CD4⁺ e de células B se mostraram diminuídas em pacientes com NL quando comparadas ao grupo controle. Ao contrário, a população células T CD8⁺ se mostrou elevada no grupo com LES com ou sem NL, inclusive em seu estado de ativação, demonstrado pela maior expressão do HLA-DR, quando comparado ao grupo CN;

- A população de células T reguladoras FoxP3⁺ nos pacientes com LES na forma sem nefrite se mostrou reduzida, em relação ao grupo controle.

3. Em relação aos possíveis efeitos dos principais medicamentos utilizados pelos pacientes com LES, a comparação dos fenótipos celulares para as células T, B e NK, permitiu as seguintes principais conclusões em relação à disfunção imune:

- O uso de azatioprina não afetou os perfis de expressão das células T, B e NK; tampouco o uso de dose maior ou menor de prednisona. Ao contrário, os usuários de hidroxicloroquina apresentaram uma maior expressão dos marcadores de células NK em relação aos não usuários.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHEARN, J. M. et al. Biomarkers for systemic lupus erythematosus. **Transl Res**, v. 159, n. 4, p. 326-42, 2012. ISSN 1878-1810.

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.

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. ISSN 1079-9907.

ARAUJO, F. F. et al. Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. **Front Biosci**, v. 12, p. 2797-806, 2007. ISSN 1093-4715.

BARATH, S. et al. Measurement of natural (CD4+CD25high) and inducible (CD4+IL-10+) regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 16, n. 7, p. 489-96, 2007. ISSN 0961-2033 (Print)0961-2033.

BASU, D. et al. Stimulatory and Inhibitory Killer Immunoglobulin-Like Receptor Molecules are Expressed and Functional on Lupus T Cells¹. **J Immunol**, v. 183, n. 5, p. 3481-7, 2009. ISSN 0022-1767 (Print)1550-6606 (Electronic).

BATAL, I. et al. Prospective assessment of C4d deposits on circulating cells and renal tissues in lupus nephritis: a pilot study. **Lupus**, v. 21, n. 1, p. 13-26, 2012. ISSN 0961-2033.

BENEDEK, T. G. William Osler and development of the concept of systemic lupus erythematosus. **Semin Arthritis Rheum**, v. 27, n. 1, p. 48-56, 1997. ISSN 0049-0172 (Print)0049-0172.

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. ISSN 0961-2033 (Print)0961-2033.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396-8, 2007. ISSN 0028-0836.

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. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591.

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. ISSN 0022-1767.

BONELLI, M. 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.

BORBA, E. F. et al. Clinical and immunological features of 888 Brazilian systemic lupus patients from a monocentric cohort: comparison with other populations. **Lupus**, v. 22, n. 7, p. 744-9, 2013. ISSN 0961-2033.

BORBA, E.F. et al. Consensus of systemic lupus erythematosus. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 48, n. 4, p. 196-207, 2008. ISSN 0482-5004.

BORCHERS, A. T. et al. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. **Autoimmun Rev**, v. 9, n. 5, p. A277-87, 2010. ISSN 1568-9972.

BOYCE, E. G.; FUSCO, B. E. Belimumab: Review of Use in Systemic Lupus Erythematosus. **Clinical Therapeutics**, v. 34, n. 5, p. 1006-1022, 2012 2012. ISSN 0149-2918.

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. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767.

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. ISSN 1462-0324.

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. ISSN 1740-2522.

COIT, P. et al. Genome-wide DNA methylation study suggests epigenetic accessibility and transcriptional poising of interferon-regulated genes in naive CD4+ T cells from lupus patients. **J Autoimmun**, v. 43, p. 78-84, 2013. ISSN 0896-8411.

COOPER, M. A.; FEHNIGER, T. A.; CALIGIURI, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. **Trends Immunol**, v. 22, n. 11, p. 633-40, 2001. ISSN 1471-4906 (Print)1471-4906. D

COSTENBADER, K. H. et al. Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 3, p. 849-57, 2004. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591.

CRISPIN, J. C. et al. Expression of CD44 variant isoforms CD44v3 and CD44v6 is increased on T cells from patients with systemic lupus erythematosus and is correlated with disease activity. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 5, p. 1431-7, 2010. ISSN 0004-3591.

CRISPIN, J. C. et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. **Trends Mol Med**, v. 16, n. 2, p. 47-57, 2010. ISSN 1471-4914 (Print)1471-499X (Electronic).

CRISPIN, J. C.; MARTINEZ, A.; ALCO CER-VARELA, J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. **J Autoimmun**, v. 21, n. 3, p. 273-6, 2003. ISSN 0896-8411 (Print)0896-8411.

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. ISSN 0022-1767.

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).

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. ISSN 1932-6203 (Electronic).

CUI, Y.; SHENG, Y.; ZHANG, X. Genetic susceptibility to SLE: recent progress from GWAS. **J Autoimmun**, v. 41, p. 25-33, 2013. ISSN 0896-8411.

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. ISSN 0198-8859.

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. ISSN 1878-1810.

DANCHENKO, N.; SATIA, J. A.; ANTHONY, M. S. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. **Lupus**, v. 15, n. 5, p. 308-18, 2006. ISSN 0961-2033 (Print)0961-2033.

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. ISSN 1521-6616.

DOLFF, S. et al. Peripheral circulating activated b-cell populations are associated with nephritis and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. **Scand J Immunol**, v. 66, n. 5, p. 584-90, 2007. ISSN 0300-9475 (Print)0300-9475.

FABIAN, M. R.; SONENBERG, N.; FILIPOWICZ, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. **Annu Rev Biochem**, v. 79, p. 351-79, 2010. ISSN 0066-4154.

FERLAZZO, G.; MUNZ, C. NK cell compartments and their activation by dendritic cells. **J Immunol**, v. 172, n. 3, p. 1333-9, 2004. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767.

FERRAZ, F. H. R. P. et al. Profile of glomerular diseases in a public hospital of Federal District, Brazil. **J. Bras. Nefrol.**, v. 32, n. 3, p. 249-256, 2010. ISSN 0101-2800.

FLESHER, D. L. T. et al. Recent advances in the genetics of systemic lupus erythematosus. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 6, n. 3, p. 461-79, 2010. ISSN 1744-666X (Print)1744-8409 (Electronic).

FOSTER, M. H. T cells and B cells in Lupus Nephritis. **Semin Nephrol**, v. 27, n. 1, p. 47-58, 2007. ISSN 0270-9295 (Print).

FREIRE, E. A. M. et al. Assessment measures in systemic lupus erythematosus. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 51, n. 1, p. 75-80, 2011. ISSN 0482-5004.

GERLI, R. et al. Identification of regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. **Autoimmun Rev**, v. 8, n. 5, p. 426-30, 2009. ISSN 1568-9972.

GLADMAN, D. D.; IBANEZ, D.; UROWITZ, M. B. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. **J Rheumatol**, v. 29, n. 2, p. 288-91, 2002. ISSN 0315-162X (Print)0315-162x.

GRAMMATIKOS, A. P.; TSOKOS, G. C. Immunodeficiency and autoimmunity: lessons from systemic lupus erythematosus. **Trends Mol Med**, v. 18, n. 2, p. 101-8, 2012. ISSN 1471-4914.

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. ISSN 0009-9104 (Print)0009-9104.

GREEN, M.R. et al. Natural killer T cells in families of patients with systemic lupus erythematosus: their possible role in regulation of IGG production. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 1, p. 303-10, 2007. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591.

GUERRA, S. G.; VYSE, T. J.; CUNNINGHAME GRAHAM, D. S. The genetics of lupus: a functional perspective. **Arthritis Res Ther**, v. 14, n. 3, p. 211, 2012. ISSN 1478-6354 (Print)1478-6362 (Electronic).

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. ISSN 1535-3699.

HEINLEN, L. D. et al. Clinical criteria for systemic lupus erythematosus precede diagnosis, and associated autoantibodies are present before clinical symptoms. **Arthritis Rheum**, v. 56, n. 7, p. 2344-51, 2007. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591.

HENRIQUES, A. et al. NK cells dysfunction in systemic lupus erythematosus: relation to disease activity. **Clin Rheumatol**, v. 32, n. 6, p. 805-13, 2013. ISSN 0770-3198.

HEPBURN, A. L. The LE cell. **Rheumatology (Oxford)**, v. 40, n.7 , p. 826 - 827, 2001. ISSN 1462-0324.

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. ISSN 1529-0131.

HERZENBERG, L. A. et al. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. **Nat Immunol**, v. 7, n. 7, p. 681-5, 2006. ISSN 1529-2908 (Print)1529-2908.

HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 40, n. 9, p. 1725, 1997. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591.

HU, N. et al. Abnormal histone modification patterns in lupus CD4+ T cells. **J Rheumatol**, v. 35, n. 5, p. 804-10, 2008. ISSN 0315-162X (Print)0315-162x.

IWATA, Y. et al. The role of cytokine in the lupus nephritis. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 594809, 2011. ISSN 1110-7243.

JAKES, R. W. et al. 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.

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. ISSN 0239-8508.

KOJURI, J. et al. QT dispersion in patients with systemic lupus erythematosus: the impact of disease activity. **BMC Cardiovasc Disord**, v. 12, p. 11, 2012. ISSN 1471-2261.

LAM, G. K.; PETRI, M. Assessment of systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol**, v. 23, n. 5 Suppl 39, p. S120-32, 2005. ISSN 0392-856X (Print)0392-856x.

LAURENT, L. et al. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. **Genome Res**, v. 20, n. 3, p. 320-31, 2010. ISSN 1088-9051.

LI, W. et al. Differential diagnosis of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis with complements C3 and C4 and C-reactive protein. **Exp Ther Med**, v. 6, n. 5, p. 1271-6, 2013. ISSN 1792-0981 (Print)1792-1015 (Electronic).

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. ISSN 0770-3198.

LIU, C. C. et al. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. **Ther Adv Musculoskelet Dis**, v. 5, n. 4, p. 210-33, 2013. ISSN 1759-720X (Print)1759-7218 (Electronic).

LOONEY, R. J.; ANOLIK, J.; SANZ, I. B lymphocytes in systemic lupus erythematosus: lessons from therapy targeting B cells. **Lupus**, v. 13, n. 5, p. 381-90, 2004. ISSN 0961-2033 (Print)0961-2033.

LU, Q. The critical importance of epigenetics in autoimmunity. **J Autoimmun**, v. 41, p. 1-5, 2013. ISSN 0896-8411.

LU, Q. et al. Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus. **J Immunol**, v. 179, n. 9, p. 6352-8, 2007. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767.

LUCAS, M. et al. Studying NK Cell/Dendritic Cell Interactions. **Methods in Molecular Biology**, v.612, p. 97-126, 2010. ISSN 978-1-60761-362-6.

LUCAS, M. et al. Dendritic Cells Prime Natural Killer Cells by trans-Presenting Interleukin 15. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 503-517, 2007. ISSN 1074-7613.

LUGER, K.; DECHASSA, M. L.; TREMETHICK, D. J. New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 7, p. 436-47, 2012. ISSN 1471-0072.

MACKAY, F.; SCHNEIDER, P. Cracking the BAFF code. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 7, p. 491-502, 2009. ISSN 1474-1733.

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. ISSN 0257-277X (Print)0257-277x.

MANDERSON, A. P.; BOTTO, M.; WALPORT, M. J. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 431-56, 2004. ISSN 0732-0582 (Print)0732-0582.

MAVRAGANI, C. P.; MOUTSOPOULOS, H. M. Lupus nephritis: current issues. **Ann Rheum Dis**, v. 62, n. 9, p. 795-8, 2003. ISSN 0003-4967 (Print)0003-4967.

MIYAKE, K.; AKAHOSHI, M.; NAKASHIMA, H. Th Subset Balance in Lupus Nephritis. **BioMed Research International**, v. 2011, 2011. ISSN 1110-7243.

MIYARA, M. et al. Global natural regulatory T cell depletion in active systemic lupus erythematosus. **J Immunol**, v. 175, n. 12, p. 8392-400, 2005. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767.

MOK, M. Y. The immunological basis of B-cell therapy in systemic lupus erythematosus. **Int J Rheum Dis**, v. 13, n. 1, p. 3-11, 2010. ISSN 1756-1841.

MOSER, K. L. et al. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. **Genes Immun**, v. 10, n. 5, p. 373-9, 2009. ISSN 1466-4879.

ORANGE, J. S.; BALLAS, Z. K. Natural killer cells in human health and disease. **Clin Immunol**, v. 118, n. 1, p. 1-10, 2006. ISSN 1521-6616 (Print)1521-6616.

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. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591.

PATSCHAN, S. et al. CD134 expression on CD4+ T cells is associated with nephritis and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Immunol**, v. 145, n. 2, p. 235-42, 2006. ISSN 0009-9104 (Print)1365-2249 (Electronic).

RAHMAN, A.; ISENBERG, D. A. Systemic lupus erythematosus. **N Engl J Med**, v. 358, n. 9, p. 929-39, 2008. ISSN 0028-4793.

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. ISSN 0961-2033 (Print)0961-2033.

ROVIN, B. H.; ZHANG, X. Biomarkers for lupus nephritis: the quest continues. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 4, n. 11, p. 1858-65, 2009. ISSN 1555-9041. D

RUBIN, R. L. et al. Effect of cigarette smoke on autoimmunity in murine and human systemic lupus erythematosus. **Toxicol Sci**, v. 87, n. 1, p. 86-96, 2005. ISSN 1096-6080 (Print)1096-0929.

RÖNNBLM, L. et al. The type I interferon system in systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 54, n. 2, p. 408-420, 2006 ISSN 1529-0131.

SACRE, K.; CRISWELL, L. A.; MCCUNE, J. M. Hydroxychloroquine is associated with impaired interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha production by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**, v. 14, n. 3, 2012. ISSN 1478-6354.

SANZ, I.; LEE, F. E. B cells as therapeutic targets in SLE. **Nat Rev Rheumatol**, v. 6, n. 6, p. 326-37, 2010. ISSN 1759-4790.

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. ISSN 0896-8411.

SCHAUREN, J. S. et al. CCR5delta32 in systemic lupus erythematosus: implications for disease susceptibility and outcome in a Brazilian population. **Lupus**, v. 22, n. 8, p. 802-9, 2013. ISSN 0961-2033.

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. ISSN 1365-2567.

SCHLEINITZ, N. et al. Natural killer cells in human autoimmune diseases. **Immunology**, v. 131, n. 4, p. 451-8, 2010. ISSN 0019-2805 (Print)1365-2567 (Electronic).

SCHWARTZMAN-MORRIS, J.; PUTTERMAN, C. Gender differences in the pathogenesis and outcome of lupus and of lupus nephritis. **Clin Dev Immunol**, v. 2012, p. 604892, 2012. ISSN 1740-2522.

SHEN, N. et al. MicroRNAs--novel regulators of systemic lupus erythematosus pathogenesis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 8, n. 12, p. 701-9, 2012. ISSN 1759-4790.

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. ISSN 1040-8711.

SELING, 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. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767.

SOARES, M. F.; TELLES, J. E. Q.; MOURA, L. A. Classifications of lupus nephritis: metanalysis and the ISN/RPS proposal. **J. Bras. Nefrol.**, v. 27, n. 3, p. 157-162, 2005.

STEIGERWALD, J. et al. Human IgG1 antibodies antagonizing activating receptor NKG2D on natural killer cells. **MAbs**, v. 1, n. 2, p. 115-27, 2009. ISSN 1942-0862 (Print)1942-0870 (Electronic).

STELZER, G. T. et al. U.S.-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. **Cytometry**, v. 30, n. 5, p. 214-30, 1997. ISSN 0196-4763 (Print)0196-4763.

STRAND, V. et al. Limitations of current treatments for systemic lupus erythematosus: a patient and physician survey. **Lupus**, v. 22, n. 8, p. 819-26, 2013. ISSN 0961-2033.

TAN, E. M. et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 25, n. 11, p. 1271-7, 1982. ISSN 0004-3591 (Print)0004-3591.

TERRIER, B. et al. Restoration of regulatory and effector T cell balance and B cell homeostasis in systemic lupus erythematosus patients through vitamin D supplementation. **Arthritis Res Ther**, v. 14, n. 5, p. R221, 2012. ISSN 1478-6354.

TIAN, Z.; GERSHWIN, M. E.; ZHANG, C. Regulatory NK cells in autoimmune disease. **J Autoimmun**, v. 39, n. 3, p. 206-15, 2012. ISSN 0896-8411.

TSOKOS, G. C. Systemic lupus erythematosus. **N Engl J Med**, v. 365, n. 22, p. 2110-21, 2011. ISSN 0028-4793.

VALENCIA, X. et al. Deficient CD4+CD25high T Regulatory Cell Function in Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus. **J. Immunol.**, v. 178, n. 4, p. 2579-2588, 2007.

VAUGHN, S. E. et al. Genetic susceptibility to lupus: the biological basis of genetic risk found in B cell signaling pathways. **J Leukoc Biol**, v. 92, n. 3, p. 577-91, Sep 2012. ISSN 0741-5400.

VILAR, M. J. P. et al. Incidence of systemic lupus erythematosus in Natal, RN, Brazil. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 43, n. 6, p. 343-346, 2003. ISSN 0482-5004.

WECKERLE, C. E.; NIEWOLD, T. B. The unexplained female predominance of systemic lupus erythematosus: clues from genetic and cytokine studies. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 40, n. 1, p. 42-9, 2011. ISSN 1080-0549.

WEENING, J. J. et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, n. 2, p. 241-50, 2004. ISSN 1046-6673 (Print)1046-6673.

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. ISSN 0007-0963 (Print)0007-0963.

XIAO, C.; RAJEWSKY, K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. **Cell**, v. 136, n. 1, p. 26-36, 2009. ISSN 0092-8674.

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. ISSN 0172-8172.

YAP, D. Y. H.; LAI, K. N. Cytokines and Their Roles in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus: From Basics to Recent Advances. **BioMed Research International**, v. 2010, 2010. ISSN 1110-7243.

YEE, C.-S. et al. 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)**, v. 178, n. 5, p. 982-988, 2011. ISSN 1462-0324.

YEE, C. S. et al. Assessment of disease activity and quality of life in systemic lupus erythematosus - New aspects. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 23, n. 4, p. 457-67, 2009. ISSN 1521-6942.

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. ISSN 1740-2522.

ZHANG, Z. et al. Global H4 acetylation analysis by ChIP-chip in systemic lupus erythematosus monocytes. **Genes Immun**, v. 11, n. 2, p. 124-33, 2010. ISSN 1466-4879.

ZHAO, M. et al. E4BP4 overexpression: a protective mechanism in CD4+ T cells from SLE patients. **J Autoimmun**, v. 41, p. 152-60, 2013. ISSN 0896-8411.

ANEXO I - 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 história 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 $4.000/\text{mm}^3$ em duas ou mais ocasiões) ou linfopenia (menor que $1.500/\text{mm}^3$ em duas ou mais ocasiões) ou plaquetopenia (menor que $100.000/\text{mm}^3$ 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.
-

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

Pts	Presença	Manifestações clínicas	Descrição
8	<input type="checkbox"/>	Convulsão	Início recente, excluídas causas metabólicas infecciosas e secundárias ao uso de drogas.
8	<input type="checkbox"/>	Psicose	Distúrbio severo da percepção da realidade, excluídas causas metabólicas e drogas. Incluem alucinações, incoerência, perda marcada das associações de ideias, pensamento pobre, ilógico; comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico.
8	<input type="checkbox"/>	Síndrome cerebral orgânica	Alteração abrupta e flutuante das funções mentais, atingindo a orientação, a atenção, a memória e outras funções intelectuais. Inclui a redução da vigília, com diminuição da atenção, acompanhada de pelo menos dois sintomas descritos a seguir – perturbação da percepção, discurso incoerente, insônia ou hipersonia diurna, aumento ou redução da atividade psicomotora. Exclui causas metabólicas, infecciosas ou secundárias ao uso de drogas.
8	<input type="checkbox"/>	Distúrbios visuais	Alteração da retina caracterizada por corpos cristóides, hemorragias retinianas, exsudatos serosos ou hemorragias do plexo coroide ou neurite óptica. Excluir hipertensão, infecções e drogas.
8	<input type="checkbox"/>	Comprometimento de pares cranianos	Neuropatia sensorial ou motora, de início ou reinício recente.
8	<input type="checkbox"/>	Cefaleia lúpica	Severa e persistente, do tipo enxaqueca que não responde a analgésicos convencionais.
8	<input type="checkbox"/>	AVC	Presença de AVC. Excluir causa aterosclerótica.
8	<input type="checkbox"/>	Vasculite	Ulcerações, gangrenas, infartos periungueais, nódulos digitais dolorosos, áreas hemorrágicas subungueais, biópsia ou angiografia de qualquer área do corpo apresentando vasculite.
4	<input type="checkbox"/>	Artrites	Envolvimento de duas ou mais articulações com sinais e sintomas de inflamação (palpação dolorosa, tumefação ou derrame articular).
4	<input type="checkbox"/>	Miosites	Dor ou fraqueza muscular proximal acompanhada de aumento de CPK/aldolase, eletromiografia alterada, biópsia compatível com miosite.
4	<input type="checkbox"/>	Cilindros urinários	Hemáticos, granulosos ou eritrocitários.
4	<input type="checkbox"/>	Hematúria	Mais de 5 eritrócitos/campo. Excluir outras causas tais como litíase renal ou infecções.
4	<input type="checkbox"/>	Proteinúria	Concentração > a 0,5 g/24 horas.
4	<input type="checkbox"/>	Piúria	Mais de 5 leucócitos/campo na ausência de infecção.
2	<input type="checkbox"/>	Rash cutâneo	Início recente ou recorrente, caráter inflamatório.
2	<input type="checkbox"/>	Alopecia	Início recente ou recorrente, excessiva, difusa ou localizada de perda de cabelo.
2	<input type="checkbox"/>	Úlcera de mucosa	Início recente ou recorrente de úlceras nasais ou orais.

2	<input type="checkbox"/>	Pleurite	Dor pleurítica com atrito, derrame ou espessamento pleural.
2	<input type="checkbox"/>	Pericardite	Dor no peito, com atrito ou derrame pericárdico, confirmado por eletrocardiograma.
2	<input type="checkbox"/>	Complemento baixo	CH50; C3 ou C4 abaixo dos valores de referência.
2	<input type="checkbox"/>	Anti-DNA	Acima dos valores de referência do laboratório.
1	<input type="checkbox"/>	Febre	Temperatura axilar >38°, na ausência de processo infeccioso.
1	<input type="checkbox"/>	Trombocitopenia	Concentração de plaquetas inferior a 100 000/mm ³ (excluídas causas farmacológicas).
1	<input type="checkbox"/>	Leucopenia	Concentração de leucócitos inferior a 3 000/mm ³ (excluídas causas farmacológicas).

_____ Soma total dos pontos

ANEXO III - Classificação morfológica da NL proposta pela ISN/RPS (2004).

Classe I: NL mesangial mínima: GN com aspecto normal a MO e com depósitos mesangiais observados na IF.

Classe II: NL proliferativa mesangial: GN com expansão de matriz ou celularidade mesangial de qualquer grau a MO, e esparsos depósitos subepiteliais ou subendoteliais observados na IF ou ME.

Classe III: NL focal: GN focal, ativa ou inativa, segmentar ou global, endo ou extracapilar, envolvendo < 50% de todos os glomérulos, podendo apresentar depósitos subendoteliais, associados ou não, a alterações mesangiais.

- Classe III (A): GN proliferativa focal com lesões ativas
- Classe III (A/C): GN proliferativa focal com lesões ativas e crônicas
- Classe III (C): GN proliferativa focal com lesões crônicas

Classe IV: NL difusa: GN difusa, ativa ou inativa, segmentar ou global, endo ou extracapilar, envolvendo $\geq 50\%$ de todos os glomérulos, podendo apresentar depósitos subendoteliais, associadas ou não a alterações mesangiais. Essa classe é dividida em NL segmentar difusa quando $\geq 50\%$ dos glomérulos envolvidos possuem lesões segmentares, e NL global difusa quando $\geq 50\%$ dos glomérulos envolvidos possuem lesões globais.

- Classe IV (S-A): GN proliferativa segmentar difusa, lesões ativas e necrotizantes.
- Classe IV (G-A): GN proliferativa global difusa, lesões ativas e necrotizantes.
- Classe IV (S-A/C): GN proliferativa segmentar difusa, lesões ativas e crônicas.
- Classe IV (G-A/C): GN proliferativa global difusa, lesões ativas e crônicas.
- Classe IV (S-C): GN proliferativa segmentar difusa, lesões crônicas com cicatrizes.
- Classe IV (C-C): GN proliferativa global difusa, lesões crônicas com cicatrizes.

Classe V: NL membranosa: GN membranosa com depósitos subepiteliais globais ou segmentares ou suas seqüelas à MO, IF ou MO, combinada ou não às classes III e IV.

Classe VI: NL esclerosante avançada: GN com mais de 90% de glomérulos escleróticos sem lesões ativas residuais.

GN: glomérulo nefrite; NL: nefrite lúpica; IF: imunofluorescência; MO: microscopia ótica; ME: microscopia eletrônica

ANEXO IV – Ficha clínica do paciente

Ficha Clínica	
Nome: _____	Prontuário: _____
Data: ____ / ____ / ____	Data de Nascimento: ____ / ____ / ____
Sexo: F (<input type="checkbox"/>) M (<input type="checkbox"/>)	Data de Diagnóstico do LES: ____ / ____ / ____
Etnia: (<input type="checkbox"/>) Caucasiano (<input type="checkbox"/>) Negro (<input type="checkbox"/>) Indígena (<input type="checkbox"/>) Asiático	
CrITÉRIOS do LÚpus: Rash Malar (<input type="checkbox"/>) Fotossensibilidade (<input type="checkbox"/>) Lesões Cutâneas Agudas ou Subagudas (<input type="checkbox"/>) Lesões Cutâneas Discóides (<input type="checkbox"/>) Outras Lesões de Pele (<input type="checkbox"/>) Úlceras Orais/Nasais (<input type="checkbox"/>) Artrite (<input type="checkbox"/>) Pleurite ou Pericardite (<input type="checkbox"/>) Proteinúria Maior que 0,5g por Dia ou 3+ ou Hematúria (<input type="checkbox"/>) Convulsão ou Psicose (<input type="checkbox"/>) Anemia Hemolítica (<input type="checkbox"/>) Leucopenia (<input type="checkbox"/>) Linfopenia (<input type="checkbox"/>) Plaquetopenia (<input type="checkbox"/>) Anti-DNA (<input type="checkbox"/>) Anti-SM (<input type="checkbox"/>) Antifosf. Anticardiolipina (<input type="checkbox"/>) Anticoagulante Lupico (<input type="checkbox"/>) VDRL (<input type="checkbox"/>) FAN (<input type="checkbox"/>)	
Quadro Clínico e Queixas: _____ _____ _____	
Sinais e Sintomas: _____ _____ _____	
Exames Anteriores: VHS: _____ PCR: _____ C3: _____ C4: _____ CH50: _____ AL: sim (<input type="checkbox"/>) não (<input type="checkbox"/>) Anticardiolipina IgM: _____ Anticardiolipina IgG: _____ Hemograma: Hm: _____ Hemoglobina: _____ Hematócrito: _____ RDW: _____ Leucócitos: _____ %Neutrófilos: _____ %Linfócitos: _____ %Eosinófilos: _____ %Basófilos: _____ %Monócitos: _____ %Outros: _____ Plaquetas: _____ Imagem sim (<input type="checkbox"/>) não (<input type="checkbox"/>) _____ Histopatologia sim (<input type="checkbox"/>) não (<input type="checkbox"/>) _____	
Medicamentos em uso e dose: 1) _____ Dose: _____ 2) _____ Dose: _____ 3) _____ Dose: _____	
Tempo de tratamento com a medicação em uso: _____	
Comorbidades sim (<input type="checkbox"/>) não (<input type="checkbox"/>) _____	
Infecções associadas sim (<input type="checkbox"/>) não (<input type="checkbox"/>) _____	
SLEDAI: _____ (<input type="checkbox"/>) Lúpus inativo (<input type="checkbox"/>) Lúpus ativo estável (<input type="checkbox"/>) Lúpus ativo com significativa piora clínica	

ANEXO V – Termo de consentimento livre e esclarecido.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O
ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS****BANCO DE DADOS E DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS DESTINADO AO ESTUDO
DE PARÂMETROS GENÉTICOS, BIOQUÍMICOS, HEMATOLÓGICOS E
IMUNOLÓGICOS RELACIONADOS A DOENÇAS AUTOIMUNES.****Projeto de pesquisa:**

“Lupus eritematoso sistêmico: aspectos hematológicos e imunológicos”

Prezado(a) Senhor(a),

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

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

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

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

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

Desde já, agradecemos a sua colaboração!

Termo de consentimento

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

Nome completo

Assinatura

____ / ____ / ____
Data

Para contato:

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa Av. Antônio Carlos, 6627

Unidade Administrativa II - 2º andar

Sala 2005

Campus Pampulha

Belo Horizonte, MG - Brasil

31270-901

ANEXO VI – Ficha clínica do grupo controle

Ficha Clínica											
Nome:						Data: ___ / ___ / ___					
Data de Nascimento: ___ / ___ / ___											
Sexo: F () M ()											
Etnia: () Caucasiano () Negro () Indígena () Asiático											
Comorbidades:											
Diabetes: sim () não ()											
Hipercolesterolemia: sim () não ()											
Hipertensão: sim () não ()											
Doenças reumáticas: sim () não () se sim, citar? _____											
Cancêr: sim () não ()											
Outras: _____											
Medicamentos em uso e dose:											
1) _____						Dose: _____					
2) _____						Dose: _____					
3) _____						Dose: _____					
4) _____						Dose: _____					
Gravidez: sim () não ()											
Infecções associadas sim () não () _____											

ANEXO VII – Resultado dos valores de P na comparação entre do uso de medicamentos entre pacientes.

Fenótipos (%)	Corticoesteróide (%)	Azatioprina (%)	Hidroxicloroquina (%)
CD3 ⁺	0,6592**	0,3112**	0,4207**
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	0,8822*	0,1709**	0,8072*
CD19 ⁺	0,9572*	0,3097*	0,6258*
CD16 ⁺	0,1181*	0,2710*	0,0975*
CD3 ⁻ CD56 ⁺	0,2302*	0,1308**	0,0023*
CD3 ⁺ CD56 ⁺	0,5233*	0,8431*	0,6885*
CD3 ⁻ CD56 ^{dim}	0,2302*	0,1310**	0,0019*
CD3 ⁻ CD56 ^{bright}	0,9709**	0,1518**	0,0125*
CD3 ⁻ CD56 ⁺ NKG2D ⁺	0,7247**	0,7200**	0,9342*
CD3 ⁺ CD56 ⁺ NKG2D ⁺	0,3963**	0,2340**	0,2159**
CD3 ⁻ CD56 ^{dim} NKG2D ⁺	0,7902**	0,7885**	0,7885**
CD3 ⁻ CD56 ^{bright} NKG2D ⁺	0,1000**	0,4542**	0,0234*
CD3 ⁺ CD8 ⁺	0,1906**	0,3651**	0,8891**
CD3 ⁺ CD8 ⁺ HLA-DR ⁺	0,1004**	0,7299**	0,1787**
CD3 ⁺ CD4 ⁺	0,6439*	0,6847**	0,8961**
CD3 ⁺ CD4 ⁺ HLA-DR ⁺	0,1027*	0,7631*	0,2820*
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{int}	0,4294**	0,2522*	0,9664**
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺	0,4689**	0,6922**	0,7096**
CD3 ⁺ NKG2D ⁺	0,4621*	0,4621*	0,4621*

* Kruskal Wallis; ** ANOVA

ANEXO VIII – Determinação dos títulos dos anticorpos utilizados nesse estudo.

Tabela 6: Título calculado *versus* anticorpos CD25, CD19 e CD56.

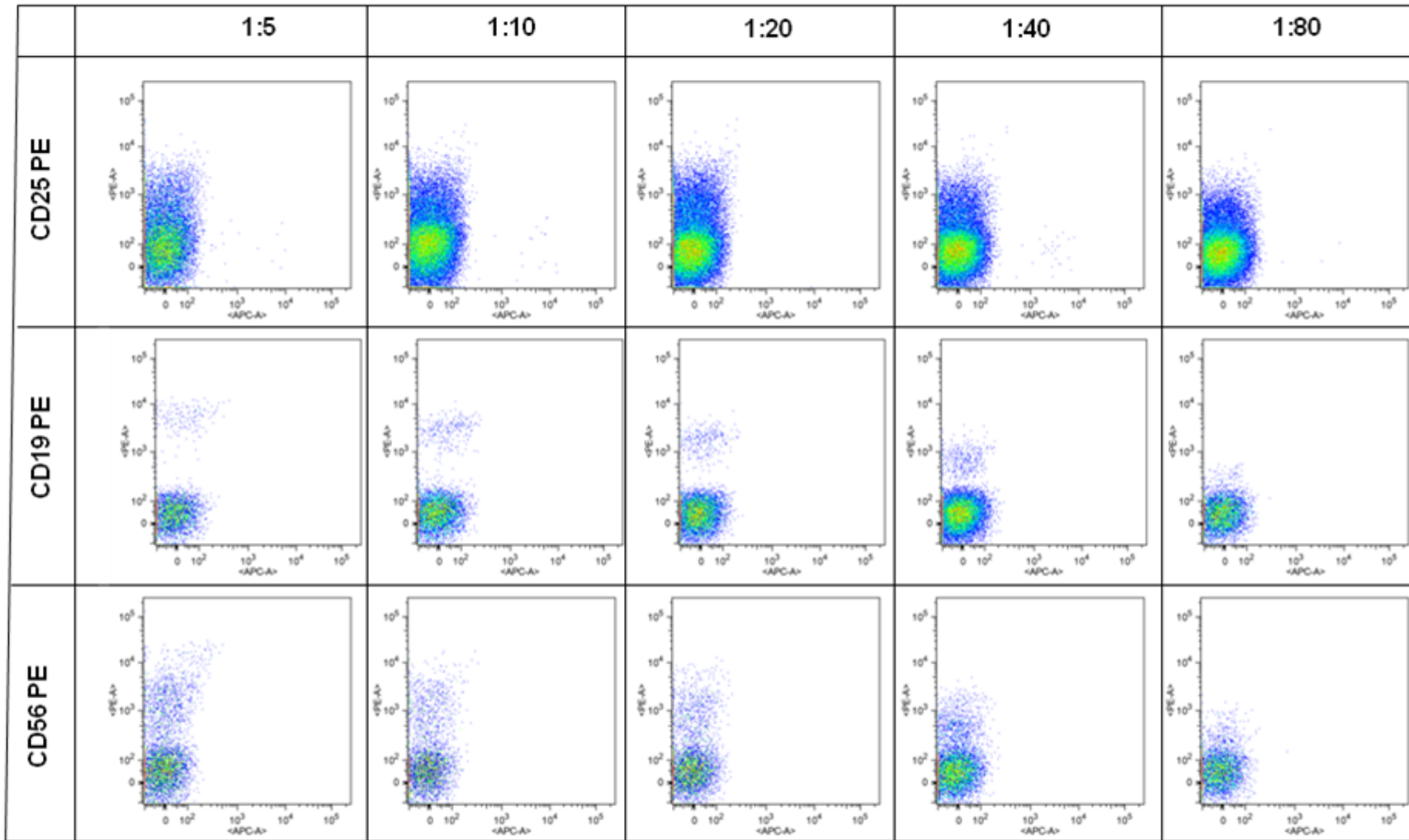


Tabela 7: Título calculado *versus* anticorpos CD3, CD4, CD8 e HLA-DR.

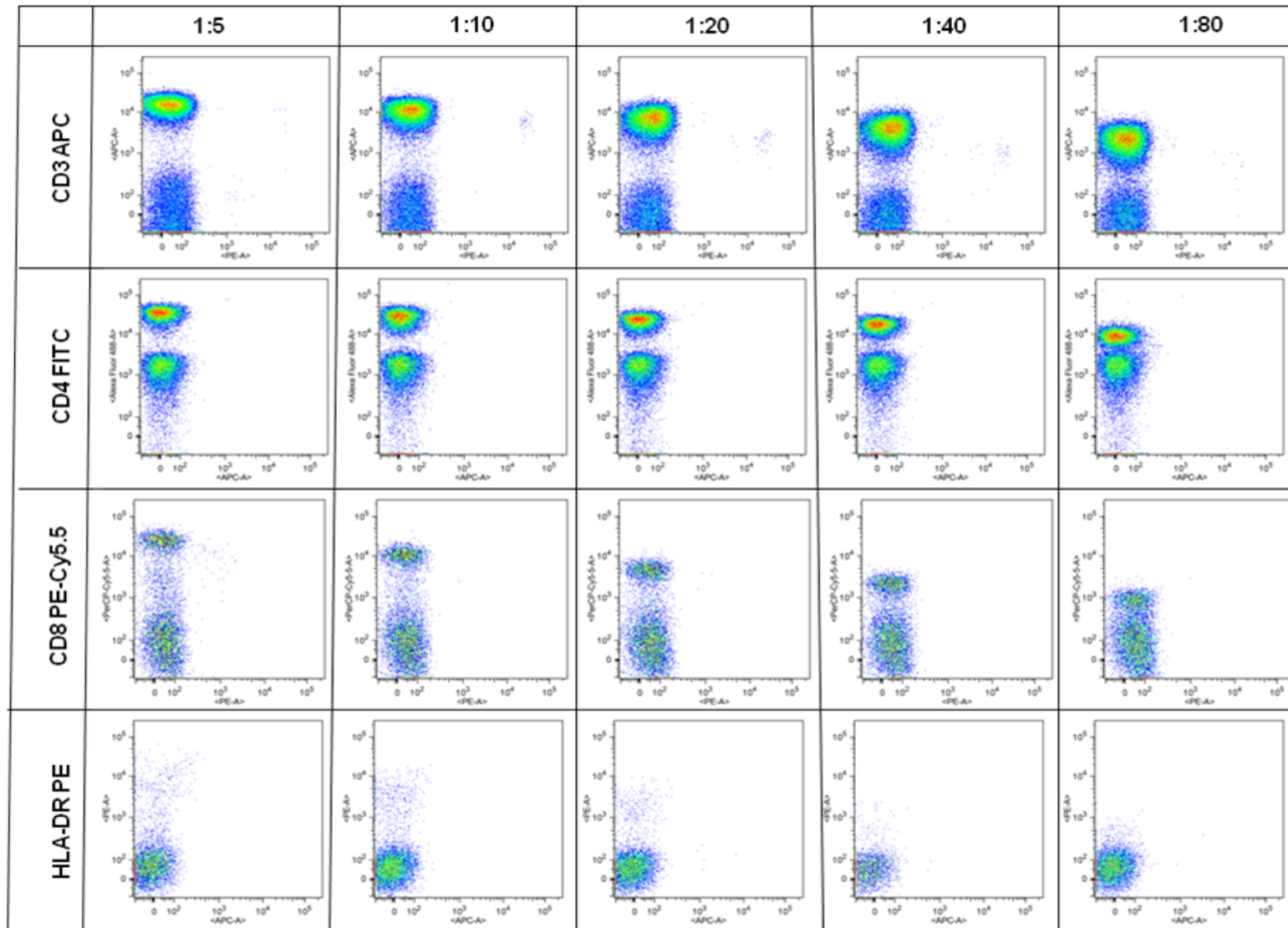


Tabela 8: Título calculado *versus* anticorpos CD16 e NKG2D.

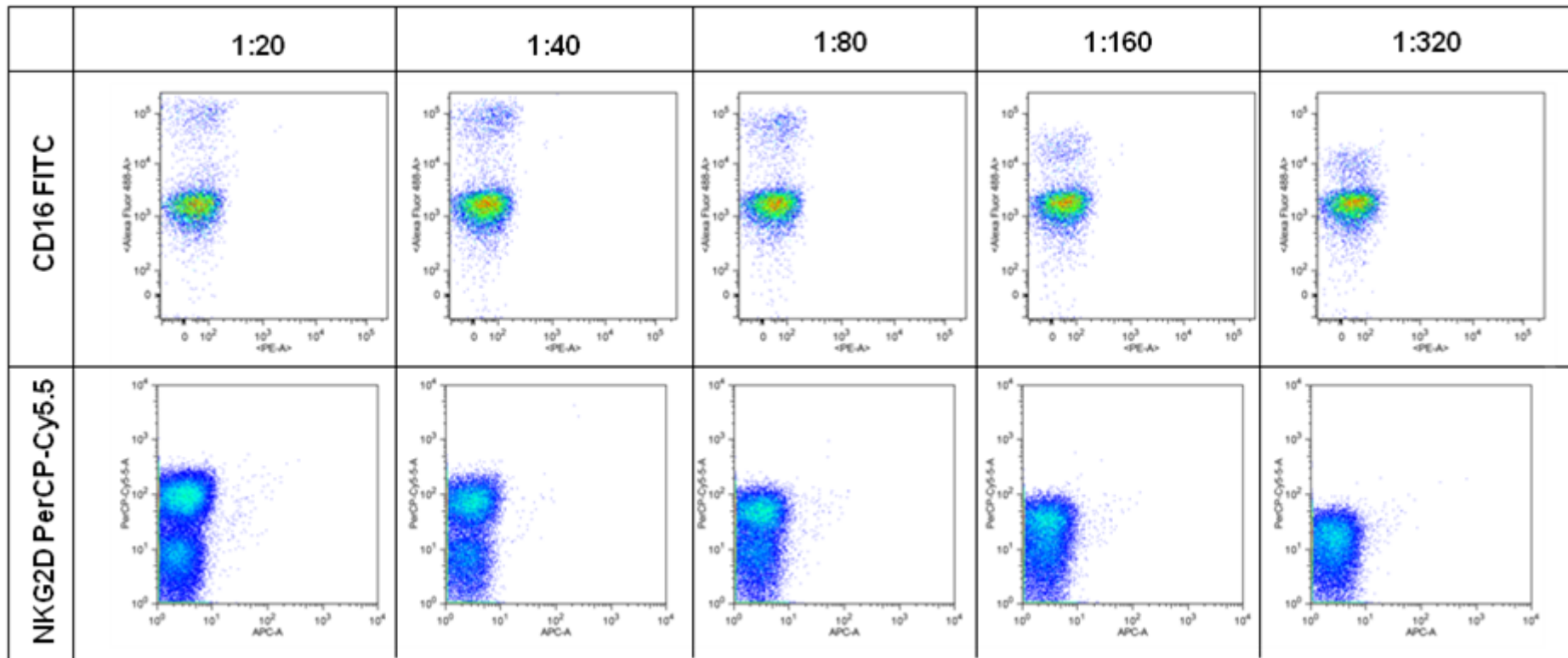


Tabela 9: Quantidade de anticorpo utilizado na padronização do marcador FoxP3.