

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

LÍLIAN FARIAS FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS APÓS ESTIMULO
DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO POR
MICROPARTICULAS EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO
EM COMPARAÇÃO COM PACIENTES COM OUTRAS DOENÇAS AUTOIMUNES.**

Belo Horizonte - MG
2018

LÍLIAN FARIAS FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS APÓS
ESTÍMULO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE
PERIFÉRICO POR MICROPARTÍCULAS EM PACIENTES COM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO EM COMPARAÇÃO COM
PACIENTES COM OUTRAS DOENÇAS AUTOIMUNES.**

Dissertação como requisito parcial, para obter o grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de concentração: Análises Clínicas e Toxicológicas

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Mara Pinto Dabés Guimarães – UFMG

Coorientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo C. P. de Toledo – UFMG

Belo Horizonte - MG
2018

F383a Ferreira, Lilian Farias.
Avaliação da caracterização de micropartículas após estímulo de células mononucleares de sangue periférico por micropartículas em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico em comparação com pacientes com outras doenças autoimunes / Lilian Farias Ferreira – 2018.
114 f. : il.

Orientadora: Tânia Mara Pinto Dabés Guimarães.
Coorientador: Vicente de Paulo C. P. de Toledo.

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

1. Lúpus eritematoso sistêmico – Teses. 2. Doenças auto-imunes – Teses. 3. Micropartículas – Teses. 4. Anticorpos – Teses. 5. Citocinas – Teses. 6. Citometria de fluxo – Teses. I. Guimarães, Tânia Mara Pinto Dabés. II. Toledo, Vicente de Paulo C. P. de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.079



FOLHA DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS AUTÓLOGAS
SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES EM PACIENTES COM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO**

LÍLIAN FARIAS FERREIRA

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

Aprovada em 31 de agosto de 2018, pela banca constituída pelos membros:

Profª. Tania Mara Pinto Dabes Guimaraes - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo - Coorientador
Universidade Federal de Minas Gerais

Profª. Cristiane Alves Silva Menezes
UFMG

Prof. Walter Batista Cicarini
Universidade Salgado de Oliveira

Belo Horizonte, 31 de agosto de 2018.

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

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

À DEUS por me permitir concluir mais uma etapa da minha vida, guiando sempre todos os meus passos e tornando-os possíveis.

Aos meus pais, Paulo e Claudia, pelo apoio incondicional e por fazerem o impossível para que eu consiga conquistar todos os meus sonhos e objetivos. Obrigada por estarem sempre comigo e serem o meu orgulho e os meus maiores exemplos, é pensando em vocês que eu tento fazer o meu melhor sempre.

Aos meus irmãos, Luana, Rafael e Rafaela, pelo apoio, companheirismo e por sempre me ajudarem mesmo não estando tão perto.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Tânia Mara Pinto Dabés Guimarães, pela confiança, compreensão e ensinamentos me recebendo carinhosamente em seu laboratório e me orientando com tamanha disponibilidade e eficiência em todas as etapas desse projeto. Muito obrigada, a Senhora foi fundamental em todo esse processo.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo, pelo apoio, ajuda e disponibilidade durante esse período. Obrigada por me apresentar ao grupo de pesquisa em Lúpus.

À Dra. Fernanda Freire Campos Nunes e a Dra. Luara Isabela dos Santos pela ajuda no desenvolvimento do projeto.

Ao Josimar Dornelas Moreira por todo o apoio e ajuda, mesmo que à distância, no desenvolvimento do projeto e por sempre estar disponível.

À todos os meus amigos, em especial à Aline pela convivência diária e companheirismo em todos os momentos.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Clínica pela convivência, ajuda, companheirismo e apoio: Isabela, Gabrielle, Augusto, Edilene, Sr. Vicente em especial ao Luan por toda a sua disponibilidade em ajudar.

Aos amigos do PPGACT, em especial à Alessandra e à Larissa pela convivência, ajuda e apoio.

Aos professores da Faculdade de Farmácia e aos do PPGACT, em especial a Profª Drª Maria das Graças Carvalho, coordenadora do grupo de pesquisa em Lúpus.

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia e aos do PPGACT, em especial a Fernanda Oliveira por todo o auxílio no Citômetro de Fluxo.

À professora Dra. Edna Afonso Reis pelo auxílio nas análises estatísticas.

Às Dra. Gilda Aparecida Ribeiro e Dra. Ana Flávia Madureira de Pádua Dias por me receberem tão bem no HC-UFMG e na Santa Casa de Misericórdia e pela ajuda na coleta de pacientes.

Aos colaboradores do HC-UFMG que me auxiliaram no contato com os pacientes. Dra. Cristina Lanna, Dra. Débora Cerqueira, Dra. Maria Raquel, Dra. Fabiana, Dra. Maria Fernanda, Dra. Rosa Weiss, Dr. Ricardo, Dr. Gustavo. À todos os Médicos Residentes pela prestatividade. E ao funcionários, em especial à Neusa por toda ajuda.

Aos colaboradores da Santa Casa de Misericórdia que me auxiliaram no contato com os pacientes. Dra. Ana Carolina, Dra. Cláudia e Dr. Eduardo. À todos os Médicos Residentes pela prestatividade.

À CAPES e FAPEMIG pela ajuda financeira.

Por fim, à todas as pacientes e voluntárias que aceitaram participar do projeto e acreditaram no trabalho. MUITO OBRIGADA.

RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica e sistêmica. Micropartículas (MPs) podem conduzir a inflamação e a autoimunidade por múltiplos mecanismos, e exibir as proteínas da superfície celular da célula-mãe que podem ser detectadas por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência permitindo a identificação de sua origem. Embora critérios clínicos e laboratoriais sejam usados corretamente para monitorar efeitos terapêuticos, ainda não existe um marcador de remissão de doença ou atividade. Níveis aumentados de MPs derivadas de células e da célula parental podem sugerir uma influência significativa no prognóstico da doença. Esse estudo tem como objetivo caracterizar MPs de pacientes com LES, originadas de células CD4+, CD8+, CD14+, CD20+, CD42a+, CD54+ e CD61+, presentes no plasma de pacientes de baixa e de moderada/alta atividade e produção de IL-10 e IFN- γ por Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) após estimulação com MPs autólogas desses pacientes após a marcação com anticorpos específicos através de Citometria de Fluxo (CF), visando um melhor conhecimento de seu papel na modulação da resposta imune no LES.

O estudo foi conduzido com quinze pacientes do sexo feminino, com LES diagnosticado pelos critérios da *American College of Rheumatology* (ACR), sete com baixa atividade SLEDAI-2k \leq 4 (LESABA) e oito com moderada/alta atividade SLEDAI-2k $>$ 4 (LESAMA), e dois grupos controle, 5 mulheres com outras doenças autoimunes (ODA) e 5 mulheres voluntárias saudáveis (CT). No grupo controle, os níveis de MPs originadas de células CD4+ e CD14+ foram significativamente diferentes quando comparado com os grupos LESABA, LESAMA e ODA. Não houve diferença significativa nos níveis das MPs entre os diferentes grupos de pacientes. Não houve diferença significativa nos níveis de MPs CD8+, CD42a+, CD54+ e CD61+ entre os diferentes grupos do estudo. No entanto, no grupo ODA a produção de IFN- γ pelas células CD8+ foi maior do que os grupos CT e LESAMA, mas não houve diferença na produção de IFN- γ pelas células CD4+. Não houve diferença significativa nas CMSP CD4+, CD8+, CD14+ e CD19+ após estímulo com MPs, bem como na produção de IL-10 por CD4+ e CD8+, não houve diferença.

Este estudo apresenta uma importância significativa devido ao fato de que até o momento, não existem marcadores específicos que possam ser usados no diagnóstico e prognóstico do Lúpus.

Palavras chave: Lúpus Eritematoso Sistêmico. Atividade da doença. SLEDAI-2k. Micropartículas. Anticorpos. Citocinas. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic and systemic autoimmune disease. Microparticles (MPs) can lead to inflammation and autoimmunity by multiple mechanisms and display the cell surface proteins of the parent cell that can be detected by flow cytometry and fluorescence microscopy allowing identification of their origin. Although clinical and laboratory criteria are currently used to monitor therapeutic effects, there is still no marker of remission of disease or activity. Increased levels of cell-derived MPs and the parent cell may suggest a significant influence on the prognosis of the disease. This study aims to characterize the MPs of patients with SLE, originated from cells CD4+, CD8+, CD14+, CD20+, CD42a+, CD54+ e CD61+ gifts in the plasma of patients with low and moderate/high activity and IL-10 and IFN- γ production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) after stimulation with autologous MPs from these patients through specific antibody labeling by flow cytometry (CF), aiming a better understanding of their role in the modulation of the immune response in SLE.

The study was conducted in patients, fifteen female with SLE diagnosed by the American College of Rheumatology (ACR), seven with low activity SLEDAI-2k \leq 4 (LESABA), eight with moderate / high activity SLEDAI-2k $>$ 4 (LESAMA), and 2 two control groups, 5 women with other autoimmune diseases (ODA) and 5 healthy women-volunteers (CT). In the CT group of MPs derived from CD4 + and CD14 + cells were significantly different when compared with LESABA, LESAMA and ODA groups. There was no significant difference in the levels of MPs among the different groups of patients. There was no significant difference in the level of CD8 +, CD42a +, CD54 + and CD61 + MPs among the different groups in study. However, in the ODA group the IFN- γ production by CD8 + cells was higher than CT and LESAMA groups, but there was no difference in IFN- γ production by CD4 + cells. No significant difference was observed in CD4 +, CD8 +, CD14 + and CD19 + cells of PBMC after stimulation with MPs as well as in the IL-10 production by CD4 + and CD8 +. This study has a significant importance because now there are no specific markers that can be used in the diagnosis and prognosis of lupus.

Key words: Systemic Lupus Erythematosus. Disease activity. SLEDAI-2k.
Microparticles. Antibodies. Cytokines. Flow cytometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Papel da inflamação na patologia do LES.	27
Figura 2 -	Patogênese do LES mediada por autoanticorpos.	29
Figura 3 -	Papel das células B.	32
Figura 4 -	Gate de Micropartículas – Tamanho x Anexina +.	52
Figura 5 -	Gate de Micropartículas provenientes de CD4(A), CD8(B), CD20(C), CD14(D), CD54(E), CD42(F) e CD61(G).	53
Figura 6 -	Gate de Linfócitos – Tamanho (FSC) X Granulosidade (SSC).	54
Figura 7 -	Dot-plot das populações de CD4+(A), CD8+(A), CD14+(B) e CD19+(C).	54
Figura 8 -	Dot-plot das populações de CD4(A) e CD8(B) produtoras de IL-10.	55
Figura 9 -	Dot-plot das populações de CD4(A) e CD8(B) produtoras de IFN-γ.	55
Figura 10 -	Fluxograma do delineamento experimental	57
Figura 11 -	Comparação das médias das idades entre os grupos	59
Figura 12 -	Boxplots de CMSP CD4+ e CD8+ produzindo IL-10	66
Figura 13 -	Boxplots de CMSP CD4+ e CD8+ produzindo IFN-γ.	67
Figura 14 -	Boxplots de CMSP CD14+ e CD19+.	68
Figura 15 -	Gráfico de correlação entre as idades e tempo de diagnóstico das pacientes com LES com o índice SLEDAI-2k.	69
Figura 16 -	Gráfico de correlação entre as análises do hemograma das pacientes com LES e o índice SLEDAI-2k.	70
Figura 17 -	Gráfico de correlação entre as análises C3, C4, PCR, TGO, TGP, Ureia, Creatinina das pacientes com LES e o índice SLEDAI-2k.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Antígenos de superfície que caracterizam a origem das Micropartículas	39
Tabela 2 -	Anticorpos utilizados na marcação de MPs	49
Tabela 3 -	Anticorpos utilizados para imunofenotipagem	50
Tabela 4 -	Anticorpos anti-citocinas	51
Tabela 5 -	Dados demográficos dos participantes do estudo	60
Tabela 6 -	Critérios ACR apresentados pelas pacientes com LES no momento do diagnóstico	60
Tabela 7 -	Critérios SLEDAI-2k pontuados pelas pacientes com LES	61
Tabela 8 -	Resultados do hemograma de pacientes com LES e ODA coletados dos prontuários médicos no momento da coleta	62
Tabela 9 -	Exames laboratoriais das pacientes com LES e ODA coletados dos prontuários médicos no momento da coleta	63
Tabela 10 -	Comparação das medianas da quantificação e caracterização das MPs	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

%	Porcentagem
>	Maior que
<	Menor que
≤	Menor ou igual a
°C	Grau(s) Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ALT	Alanina-aminotransferase
Anti-DNA	Anticorpo anti-DNA
Anti-dsDNA	Anticorpo anti-DNA de fita dupla
Anti-RNP	Anticorpo anti-ribonucleoproteína
Anti-Sm	Anticorpo anti-antígeno <i>Smith</i>
Anti-SSA/Ro	Anticorpo anti-antígeno Ro
Anti-SSB/La	Anticorpo anti-antígeno La
APC	Aloficocianina
AR	Artrite Reumatóide
AST	Aspartato-aminotransferase
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BAFF	Fator de ativação de células B
BD	<i>Becton Dickinson</i>
BDCA-2	<i>Blood dendritic cell antigen 2</i>
BLK	Tirosina-quinase de Linfócitos B
BV605	<i>Brilliant™ Violet</i>
C1	Componente 1 do Sistema de complemento
C1q	Componente 1q do Sistema de complemento
C2	Componente 2 do Sistema de complemento
C2b	Componente 2b do Sistema de complemento
C3	Componente 3 do Sistema de complemento
C3a	Componente 3a do Sistema de complemento
C3b	Componente 3b do Sistema de complemento
C4	Componente 4 do Sistema de complemento

C4b	Componente 4b do Sistema de complemento
C5a	Componente 5a do Sistema de complemento
CD134	<i>Cluster of Differentiation 134</i>
CD134L	<i>Receiver of Cluster of Differentiation 134</i> Ligante
CD14	<i>Cluster of Differentiation 14</i>
CD19	<i>Cluster of Differentiation 19</i>
CD20	<i>Cluster of Differentiation 20</i>
CD25	<i>Cluster of Differentiation 25</i>
CD31	<i>Cluster of Differentiation 31</i>
CD4	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD40	<i>Cluster of Differentiation 40</i>
CD42a	<i>Cluster of Differentiation 42a</i>
CD45	<i>Cluster of Differentiation 45</i>
CD54	<i>Cluster of Differentiation 54</i>
CD61	<i>Cluster of Differentiation 61</i>
CD8	<i>Cluster of Differentiation 8</i>
CD80	<i>Cluster of Differentiation 80</i>
CD86	<i>Cluster of Differentiation 86</i>
CH50	Atividade hemolítica 50% do sistema de complemento
CO ₂	Dióxido de Carbono
dL	Decilitro
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
COEP	Comissão de Ética e Pesquisa
CT	Indivíduos saudáveis
CXCL-10	<i>Interferon-inducible protein 10</i>
DC	Células dendríticas
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxiribonucléico)
DNAse1	<i>Deoxyribonuclease 1</i>
EBV	Vírus Epstein-Barr
EQU	Exame qualitativo de urina
ES	Esclerose Sistêmica
EUA	Estados Unidos da América
FAN-Hep2	Fator anti-nucleares em células Hep2
Fc	Fração constante (cristalizável)

FCGR I		Receptor I de baixa afinidade para a região Fc da Imunoglobulina
	G	
FCGR II		Receptor II de baixa afinidade para a região Fc da Imunoglobulina
	G	
FCGR III		Receptor III de baixa afinidade para a região Fc da Imunoglobulina
	G	
FitC		<i>Fluorescein-5-isothiocyanate</i>
Foxp3		<i>Forkhead box P3</i>
FSC		<i>Forward Scatter</i> (tamanho)
h		hora
HIV		<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HLA		Antígeno Leucocitário Humano
HMGB1		<i>High-mobility group protein 1</i>
IC		Imunocomplexos
IFN		Interferon
IFN- α		Interferon alfa
IFN- γ		Interferon gama
IgE		Imunoglobulina E
IgG		Imunoglobulina G
IgG4		Imunoglobulina G classe 4
IgM		Imunoglobulina M
IL-1		Interleucina 1
IL-2		Interleucina 2
IL-3		Interleucina 3
IL-4		Interleucina 4
IL-5		Interleucina 5
IL-6		Interleucina 6
IL-8		Interleucina 8
IL-10		Interleucina 10
IL-12		Interleucina 12
IL-17		Interleucina 17
IL-18		Interleucina 18
ILT7		Transcrito semelhante à imunoglobulina 7

IRF5	Fator regulatório 5 do Interferon
ITGAM	Integrina alfa M
LDH	Desidrogenase láctica
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LESABA	Lupus Eritematoso Sistêmico de baixa atividade
LESAMA	Lupus Eritematoso Sistêmico de moderada/alta atividade
MDC	Célula Dendritica Mielóide
MFF	<i>Macs Facs Fix</i>
mg	Miligrama
MHC II	Complexo de histocompatibilidde principal classe II
mL	Mililitro
MPO	Mieloperoxidade
MPs	Micropartículas
NK	Natural <i>killer</i>
ODA	Outras doenças autoimunes
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS-P	<i>Phosphate Buffered Saline – Perm</i> (tampão de permeabilização)
PBS-W	<i>Phosphate Buffered Saline – Wash</i> (tampão de lavagem)
PCR	Proteína C reativa
PDC	Célula dendritica plasmocitoide
PE	Ficoeritrina
PECy-5	Ficoeritrina-Cianina5
PHA	<i>Phytohemagglutinin</i>
PLP	Plasma livre de plaquetas
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PR	Paraná
PR3	Proteinase 3
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
PS	Fosfatidilserina
PTPN22	Proteína Tirosina Fosfatase não receptora tipo 22
RN	Rio Grande do Norte
RNA	<i>Ribonuclic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

s	Segundo
SBR	Sociedade Brasileira de Reumatologia
SLEDAI-2K	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2K</i>
SLICC	<i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SSC	<i>Side Scatter</i> (granulosidade)
STAT4	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 4
TAP 1	Transportador associado ao processamento do antígeno 1
TAP 2	Transportador associado ao processamento do antígeno 2
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de células T
TGF- β	Fator de crescimento transformador- β
Th1	Células T helper tipo 1
Th2	Células T helper tipo 2
Th3	Células T helper tipo 3
Th17	Células T helper tipo 17
TLR3	Receptor <i>Toll-like</i> 3
TLR7	Receptor <i>Toll-like</i> 7
TLR9	Receptor <i>Toll-like</i> 9
™	Marca registrada
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Células T reguladoras
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Radiação Ultravioleta
UV-B	Radiação Ultravioleta B
V450	Horizon™ 450
VDRL	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
VHS	Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	20
1.1.1. <i>Epidemiologia</i>	22
1.1.2. <i>Patogenia</i>	25
1.1.2.1. <u>Mecanismos da Patogenia</u>	26
1.1.3. <i>Diagnóstico</i>	34
1.1.4. <i>Tratamento</i>	37
1.2. Micropartículas.....	37
2. JUSTIFICATIVA.....	42
3. OBJETIVOS.....	43
3.1. Objetivo Geral.....	43
3.2. Objetivos Específicos.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1. Normas Éticas.....	44
4.2. Seleção de Voluntários.....	44
4.2.1. <i>Critérios de Inclusão</i>	45
4.2.2. <i>Critérios de Exclusão</i>	46
4.3. Estudos Laboratoriais.....	46
4.3.1. <i>Obtenção das Amostras de Sangue</i>	46
4.3.2. <i>Purificação de Células Mononucleares de Sangue Periférico</i>	47
4.3.3. <i>Purificação de Micropartículas</i>	48
4.3.4. <i>Quantificação e Caracterização de Micropartículas</i>	48
4.3.5. <i>Cultivo de Células Mononucleares de Sangue Periférico</i>	49
4.3.6. <i>Marcação das Células Mononucleares de Sangue Periférico</i>	50
4.4. Aquisição de Dados.....	51
4.4.1. <i>Quantificação de Micropartículas</i>	51
4.4.2. <i>Análise de Células Mononucleares de Sangue Periférico</i>	53
4.5. Análise Estatística.....	56
4.6. Delineamento Experimental.....	56
5. RESULTADOS.....	58
5.1. Resultados Laboratoriais.....	61

5.2. Caracterização de Micropartículas.....	64
5.3. Análise de Células Mononucleares de Sangue Periférico.....	65
5.4. Correlações entre os exames laboratoriais e o SLEDAI-2k das pacientes.....	68
6. DISCUSSÃO.....	73
7. CONCLUSÃO.....	84
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	86
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXOS.....	100
ANEXO I.....	100
ANEXO II.....	101
ANEXO III.....	103
ANEXO IV.....	105
ANEXO V.....	106
ANEXO VI.....	107
APÊNDICES.....	109
APÊNDICE I.....	109
APÊNDICE II.....	110
APÊNDICE III.....	111
APÊNDICE IV.....	112
APÊNDICE V.....	113

1 INTRODUÇÃO

1.1. Lúpus Eritematoso Sistêmico

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune de caráter inflamatório e curso crônico que apresenta um desenvolvimento clínico variável podendo apresentar quadros de remissão ou quadros de atividade da doença (presença de sinais e sintomas) (MIRABELLI et al, 2015). As principais características são: perda de tolerância imunológica com consequente presença de células T e B hiperreativas, reação de hipersensibilidade do tipo III, produção de autoanticorpos contra antígenos nucleares e citoplasmáticos, aumento da formação e deficiência na remoção de imunocomplexos que ativam o sistema de complemento gerando processos inflamatórios, e sua deposição em diversos órgãos que levam à lesão celular ou tecidual (FREIRE et al, 2011; GOTTSCHALK et al, 2015; CHOI et al, 2017).

A causa do desenvolvimento do LES ainda não está bem definida, mas sabe-se hoje que fatores hormonais (estrógeno), ambientais (como radiação ultravioleta (UV), estresse, medicação ou infecção) e genéticos (maior prevalência de LES em parentes de 1º e 2º graus) apresentam uma forte ligação com a predisposição do seu surgimento (FREIRE et al, 2011; GOTTSCHALK et al, 2015). Essa característica multifatorial faz com que o LES possa apresentar um largo espectro de manifestações clínicas, as quais podem comprometer diversos órgãos como rins, cérebro, pele, pulmões, coração e articulações. Além disso, a progressão da doença é não-linear e segue um curso remitente-recorrente devido à sua natureza heterogênea. O prognóstico e a gravidade da doença podem variar bastante de indivíduo para indivíduo (GOTTSCHALK et al, 2015; VASQUEZ-CANIZARES et al, 2017).

O maior número de mulheres com LES sugere uma contribuição significativa de fatores hormonais no surgimento da doença, além disso, hormônios sexuais (estradiol, testosterona, prolactina e progesterona) influenciam no funcionamento do sistema imune (PARKS et al, 2017). Segundo Lateef e Petri (2012) o uso de contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal podem aumentar o risco do desenvolvimento de LES.

Associações de LES com fatores intrínsecos, incluindo peso ao nascer, história reprodutiva (número de filhos, idade da menarca e menopausa), endometriose e infecções latentes como o vírus Epstein-Barr (EBV) podem refletir um papel indireto das exposições ambientais (PARKS et al, 2005, 2016).

Sabe-se que a exposição a raios UV é prejudicial para indivíduos com LES, porém não está claro se realmente ela é um fator que desencadeia o surgimento da doença ou apenas influencia no mau prognóstico da doença. Porém, acredita-se que o UV-B, pode estar associado a morte celular com exposição de auto-antígenos, gerando espécies reativas de oxigênio que danificam o DNA produzindo autoantígenos e células T autorreativas, além disso ele pode ter efeito também imunomodulador sobre as células T e citocinas, os quais são fatores envolvidos na patogênese do LES (PARKS et al, 2017).

A exposição a raios UV geram crises de LES, porém essa exposição é a principal fonte exógena de Vitamina D, a qual tem função imunossupressora, o que pode sugerir que a radiação UV-B poderia exercer um papel protetor contra LES através da produção de Vitamina D. Estudos relataram baixas concentrações de Vitamina D em pacientes com LES, porém essa deficiência pode ser consequência de um quadro de doença crônica (KUHN e BEISSERT, 2005; COSTENBADER et al, 2008).

Young et al (2016) observaram que pessoas susceptíveis (parentes de pessoas com LES) com deficiência de vitamina D eram mais propensas a transição para o LES principalmente quando associado a via metabólica da vitamina D.

Outro fator associado ao surgimento do LES é o fator hereditário, gêmeos monozigóticos tem mais chance de terem LES quando comparados com dizigóticos, 24-58% e 2%, respectivamente, segundo estudo feito por CHEN et al (2017).

A dieta também pode influenciar o desenvolvimento e o prognóstico do LES através de mecanismos epigenéticos, por exemplo, alimentos contendo micronutrientes do grupo metil tem menor probabilidade de desenvolver nefrite, nos pacientes com LES, do que aqueles que não possuem esses nutrientes (STRICKLAND, et al, 2013). O álcool contém compostos (etanol e antioxidantes) que potencialmente neutralizam a inflamação sistêmica, diminuindo as respostas celulares

e inibindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) -6 e IL-8, tanto *in vivo* como *in vitro* em macrófagos alveolares e monócitos sanguíneos humanos (WALDSCHMIDT, et al, 2008; PARKS, et al, 2017). Antioxidantes no vinho e na cerveja afetam citocinas como o interferon-gama (IFN- γ) *in vitro* e podem inibir as principais enzimas envolvidas na síntese de DNA (STRICKLAND, et al, 2013).

Análises genéticas e estudos genômicos evidenciaram vários genes humanos de suscetibilidade ao LES que são normalmente responsáveis por manter a tolerância do sistema imunológico e processos homeostáticos. Estes incluem processamento e apresentação de antígenos (HLA, TAP 1 e 2), eliminação de detritos apoptóticos (C1q, Dnase1), receptores de superfície celular de leucócitos (FCGR1/II/III, ITGAM) e moléculas de sinalização celular e transcrição gênica (BLK, PTPN22, STAT4, IRF5) (RAMOS et al, 2010; GOTTSCHALK et al, 2015).

Doenças autoimunes reumatológicas como LES, a Artrite Reumatoide (AR) e Esclerose Sistêmica (ES) apresentam desafios na clínica, uma vez que a sua etiologia não está bem clara, além do prognóstico ser variável e imprevisível, necessitando de mais estudos para melhorar o diagnóstico, a avaliação mais precisa da atividade da doença, o prognóstico e avaliação de co-morbidades que auxiliem por fim em uma melhor terapia (MCCARTHY et al, 2016).

1.1.1. Epidemiologia:

A maioria dos estudos sobre incidência de LES são desenvolvidos nos EUA ou na Europa. A dificuldade de realização desses estudos no Brasil está associado a complexidade em se diagnosticar a doença. A grande miscigenação racial e cultural do Brasil e as condições climáticas (maior risco de exposição a raios UV no norte e nordeste se comparado com o sul) geram uma ampla variedade de sintomas e quadros clínicos do LES, dificultando o diagnóstico precoce e comprometendo o tratamento e o prognóstico (VILAR e SATO, 2002; NAKASHIMA et al, 2011).

Dados de incidência e prevalência mais confiáveis são observados em estudos em países com um sistema de saúde eficiente, onde o atendimento permite que os dados sejam registrados e mantidos, os pacientes sejam corretamente diagnosticados por especialistas e conseqüentemente os dados de incidência e prevalência possam ser analisados ao longo de muitos anos (CARTER et al, 2016).

A doença pode acometer pessoas de todas as idades, raça, sexo e origens geográficas, porém mulheres em idade reprodutiva podem estar mais susceptíveis devido aos hormônios esteroides, uma vez que vários estudos mostram sua influência no desenvolvimento da doença (REES et al, 2016; GOULIELMOS et al, 2018). A proporção de mulheres com LES pode variar de 8 a 15:1 em comparação com homens dependendo da região em que está sendo analisado (MURPHY e ISENBERG, 2013).

Estudos relatam que a incidência global de LES pode variar de 0,3 por 100.000 habitantes por ano na Ucrânia a 31,5 por 100.000 habitantes por ano entre afro-caribenhos que vivem no Reino Unido, por exemplo. Já a prevalência varia de 3,2 por 100.000 habitantes a 517,5 por 100.000, na Índia e em afro-caribenhos no Reino Unido respectivamente (NASONOV et al, 2014; CARTER et al, 2016; REES et al, 2016).

Rees et al (2016) observaram uma maior incidência relatada na América do Norte (23,2 por 100.000 habitantes por ano) e menores incidências na Ucrânia (0,3 por 100.000 habitantes por ano). Além disso, observaram também que países europeus estão entre os países com menores incidências em relação as Américas e Ásia. Mulheres apresentaram maior incidência com uma razão variando de 2:1 em Minnesota-EUA (MICHET et al, 1985) a 15:1 na África (FLOWER et al, 2012).

Um estudo nos EUA nos anos de 2003-2008, estimou uma incidência de LES de 6,63 casos por 100.000 habitantes por ano, sendo 11,09 mulheres por 100.000 habitantes por ano contra 1,89 homens por 100.000 habitantes por ano, além disso, a prevalência variou de 81,07 casos por 100.000 habitantes em 2003 para 102,94 casos por 100.000 habitantes em 2008 (FURST et al, 2013).

O Brasil não apresenta dados exatos, mas a Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR) estima que cerca de 65000 pessoas tenham LES, sendo a

maioria mulheres entre 20 e 45 anos. Estima-se que 1 a cada 1700 mulheres no Brasil tenham a doença (SBR, 2018).

Segundo Vilar e Sato (2002) na cidade de Natal-RN no ano 2000 foi encontrada uma incidência estimada de 8,7 casos por 100.000 habitantes por ano, sendo 38 pacientes do sexo feminino e 5 do sexo masculino resultando em uma incidência de 14,1 por 100.000 habitantes e 2,2 por 100.000 habitantes, respectivamente. Eles observaram também que a média de idade no diagnóstico foi de 31,8 anos.

Estudo desenvolvido por Nakashima et al (2011) com dados obtidos entre os anos de 1997-1998, mostraram que a incidência de LES estimada no município de Cascavel-PR foi de 4,8 casos por 100.000 habitantes por ano, sendo a incidência entre as mulheres de 9,3 casos por 100.000 habitantes por ano.

Costi et al (2017) realizaram um estudo de mortalidade por LES no Brasil entre os anos de 2002 a 2011, onde foi observado 8761 óbitos de pacientes com LES correspondendo a uma taxa de mortalidade de 4,76 mortes por 100.000 habitantes. As regiões Centro-oeste, Norte e Sudeste apresentaram índices de mortalidade regional maiores que o índice nacional (6,44, 5,4 e 5,23 mortes por 100.000 habitantes, respectivamente). Já as regiões Nordeste e Sul apresentaram taxas inferiores, 3,69 e 4,28 mortes por 100.000 habitantes, respectivamente. Estes autores observaram também que dos 8761 óbitos, 90,7% eram do sexo feminino, 49,2% eram brancos e 45,61% tinham idade entre 20 e 39 anos.

A mortalidade no LES pode estar associado a dois fatores dependendo da fase da doença. Nos primeiros anos da doença a morte pode ocorrer geralmente por quadros de infecção, comprometimento renal ou danos no sistema nervoso central (SNC). Já em quadros mais longos da doença (crônica) o óbito está mais associado a doenças cardiovasculares associado a aterosclerose, as quais podem ou não estar ligadas ao uso de corticoides ou inflamação crônica (ASSIS e BAAKLINI, 2009; VOSS et al, 2013).

1.1.2. Patogenia:

O LES apresenta 3 formas clínicas: Lúpus discoide (afeta mais comumente a pele causando inflamações cutâneas na nuca, couro cabeludo e face), Lúpus sistêmico (em geral é a forma mais grave podendo causar lesões nas articulações, rins, coração, pulmão, cérebro) e Lúpus induzido por drogas (em geral iniciado após exposição a alguns fármacos, tais como: metildopa, quinidina, hidralazina, procainamida, isoniazida, minociclina dentre outros) (GALINDO e VEIGA, 2010; VIANNA et al, 2010; COSTA e COIMBRA, 2014).

A doença pode apresentar sintomas inespecíficos como: perda de peso, fadiga, febre, náusea, cefaleia, depressão, vômito, artralgias e mialgias, comprometimento de rins, articulações e pele (SCHUR e GLADMAN, 2011; FREIRE et al, 2011). Os principais sintomas do LES estão diretamente associados a lesões geradas nos órgãos decorrentes da formação e deposição de imunocomplexos. Essas lesões podem acarretar, em cerca de 50% dos pacientes com LES, complicações como: nefrite, vasculite, doença pulmonar intersticial e acidente vascular cerebral (AVC). Além disso, pacientes que apresentam resistência terapêutica ficam com a qualidade de vida prejudicada (FAIRHURST et al, 2006).

A nefrite lúpica está entre as complicações clínicas mais comuns e mais séria do LES, ocorrendo em cerca 74% dos pacientes e apresentando elevada morbidade e mortalidade. A nefrite resulta da deposição de imunocomplexos nos glomérulos renais, levando a inflamação e insuficiência renal definida pela histopatologia e presença de proteinúria e elementos celulares (CERVERA et al, 2006; GALINDO e VEIGA, 2010; RAMOS et al, 2010).

As manifestações hematológicas mais comuns no LES são: anemia, leucopenia (leucócitos abaixo de 4.000 mm^3), linfopenia (linfócitos abaixo de 1.500 mm^3) e plaquetopenia (plaquetas abaixo de $100.000/\text{mm}^3$ por um período mínimo de um mês) (FAYYAZ et al, 2015). Outras manifestações sanguíneas, tais como: aumento de desidrogenase láctica (LDH) associado a anemia hemolítica, aumento de bilirrubina indireta e presença de anticorpos, também são comuns (GALINDO e VEIGA, 2010).

Dentre as manifestações cardíacas as mais comuns ocasionadas pelo LES são: pericardite, miocardite, endocardite e lesões coronarianas (MINER e KIM, 2014). Também pode ocorrer no curso da doença o desenvolvimento de danos pulmonares (pleurite, serosite e pneumonite) e danos neurológicos (AVC, isquemia transitória, disfunção cognitiva, estado confusional agudo, convulsões, desordem e/ou psicose, cefaleias, dentre outros não associados a fármacos, infecções ou distúrbios metabólicos) (GALINDO e VEIGA, 2010; COJOCARU et al, 2011; CROOKSTON et al, 2013).

Em geral a artrite é o acometimento articular mais comum no LES, atingindo cerca de 69-95% dos pacientes, sendo comum a ocorrência em mãos, punhos e joelhos (GALINDO e VEIGA, 2010).

1.1.2.1. Mecanismos da patogenia

O LES é uma doença autoimune e como tal é decorrente de alterações no funcionamento do sistema imune. Tanto a resposta imune inata quanto a adquirida estão relacionadas com a patogenia. A resposta imune inata é responsável tanto pelas lesões teciduais, através da produção e liberação de citocinas inflamatórias, como também pela ativação de células T e B (resposta imune adaptativa), as quais são responsáveis por processos inflamatórios e produção de autoanticorpos (CHOI et al, 2012). Porém, a grande questão é que ainda hoje sabe-se pouco sobre a patogênese do LES, o que compromete o diagnóstico precoce e principalmente o tratamento, fazendo com que as opções terapêuticas sejam limitadas através de corticóides e imunossupressores, o que podem acarretar em risco de intoxicação (PERL et al, 2010).

A inflamação é um fator chave na patogênese do lúpus. A doença é mediada por células B hiperrativas que produzem autoanticorpos da classe IgG (Imunoglobulina G), que devido a uma falha no processo de deleção clonal, caem na circulação sanguínea e se ligam a antígenos específicos, como por exemplo DNA, proteínas nucleares e certos componentes citoplasmáticos gerando uma reação de hipersensibilidade do tipo III responsáveis pela formação de um quadro inflamatório

crônico (CARROLL, 2004; GOTTSCHALK et al, 2015). A principal característica do lúpus é a presença de células B hiperativas com perda da tolerância, formando complexos imunes contendo autoantígenos de ácido nucléico, os quais podem ativar TLRs endossomais e promover um quadro inflamatório. Expansão de células plasmáticas e a produção de auto-anticorpos também são características, embora os auto-anticorpos possam ser benignos, a menos que gerados em um meio inflamatório, em que a troca de classe para os isotipos patogênicos ocorrem. Além disso, citocinas pró-inflamatórias auxiliam na ativação das células T e na maturação das células dendríticas, podendo estimular uma hematopoiese com expansão de células imunes inatas, induzindo a produção de proteínas de fase aguda (APPs). Outra característica na patogênese do LES é a deposição de auto-anticorpos em tecidos como os glomérulos do rim, os quais ativam células efetoras mielóides via Fc e receptores de complemento, provocando destruição tecidual. Inúmeros fatores, incluindo composição genética, ambiente, dieta e estresse, podem modificar o curso e a gravidade da doença. (**Figura 1**) (RAVETCH e BOLLAND, 2001; GOTTSCHALK et al, 2015).

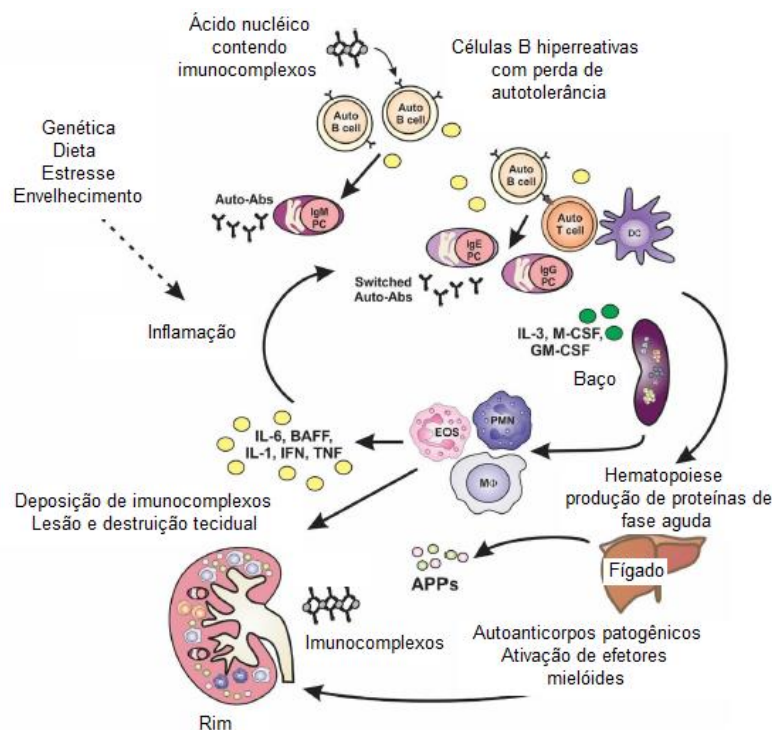


Figura 1 - Papel da inflamação na patologia do LES.

Fonte: Adaptado de GOTTSCHALK et al, 2015.

Auto B cell – células B autorreativas; Auto T cell – células T autorreativas; DC – células dendríticas; Auto-Abs – autoanticorpos; Ig (M, E, G) – Imunoglobulinas (M, E, G); IL (1, 3, 6) – Interleucinas (1, 3, 6); IFN – Interferon; TNF – Fator de necrose tumoral.

A presença de anticorpos no LES é evidência de uma memória imunológica dependente de clones de linfócitos. A afinidade e o tamanho dos linfócitos B, a presença de anticorpos e células T autorreativas podem estar associados a atividade da doença, isto é, clones pequenos produzem poucos anticorpos e conseqüentemente tendem a ser característico de remissão da doença, porém se esse pequeno número apresentar alta afinidade pode ser característico de LES latente ou persistente (HIEPE et al, 2011; THAPA et al, 2015; WEIDENBUSCH et al, 2017).

Estímulos que induzam a expansão clonal dos linfócitos B, como por exemplo, aumento de citocinas, podem acarretar em uma ativação da doença (WEIDENBUSCH et al, 2017). Alguns fatores tem sido associados ao surgimento do LES, tais como, infecções e morte celular. Em geral patógenos apresentam padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), os quais ativam receptores de reconhecimento padrão (PRR), que por sua vez induzem a apresentação de antígenos, ou seja, a imunidade inata ativa a imunidade adaptativa que pode ser responsável por uma autoimunidade (ALLAM e ANDERS, 2008). A morte celular ocasionada por raios UV-B, teria a capacidade de expor autoantígenos que se ligariam a autoanticorpos (WEIDENBUSCH et al, 2017).

Os autoanticorpos produzidos no LES tendem a ser específicos para antígenos de núcleos celulares, como DNA de cadeia dupla, histonas e proteínas ribonucleares. Células B autorreativas são ativadas e passam por recombinação, hipermutação somática e seleção clonal para formar células B efetoras e de memória. Células B efetoras produzem autoanticorpos da classe IgG, liberados na circulação, os quais irão se ligar a antígenos próprios formando imunocomplexos. Apesar dos mecanismos normais, como o sistema de complemento, para a absorção e eliminação de imunocomplexos, o excesso de complexos imunes acumulam-se nos pequenos vasos de órgãos, como nos rins, no SNC, no endotélio vascular e nas articulações, onde facilitam a formação de lesões e a ativação local do sistema de complemento, degranulação dos mastócitos e à infiltração de neutrófilos e macrófagos (**Figura 2**) (CARROLL, 2004).

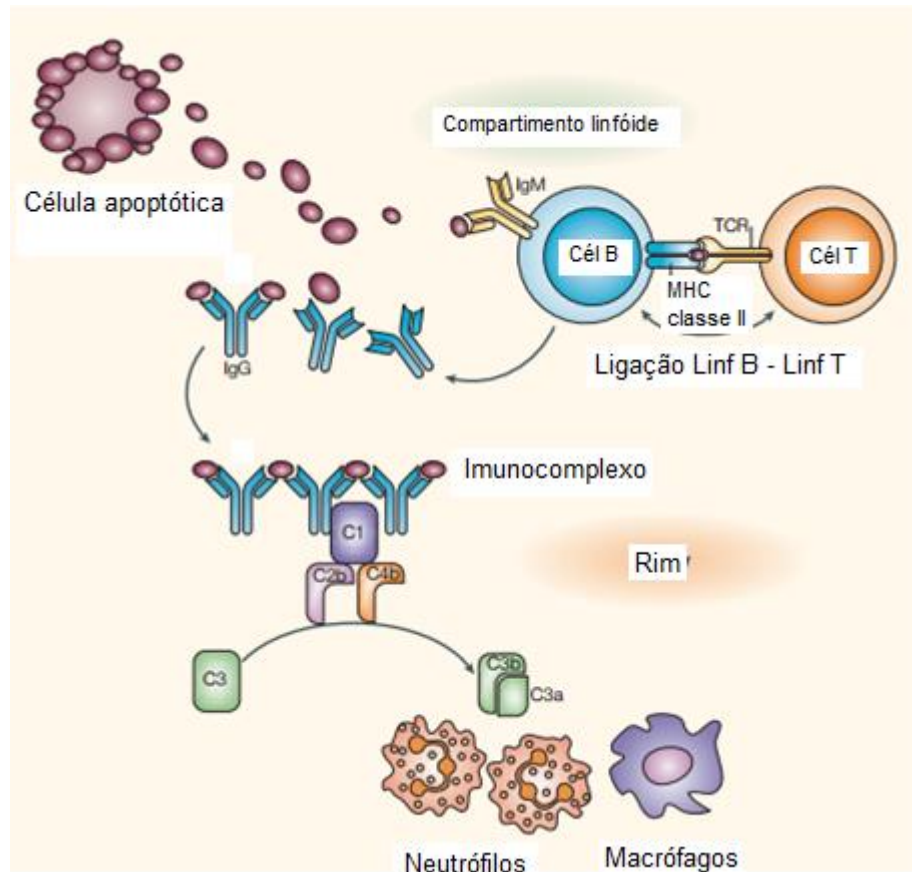


Figura 2 - Patogênese do LES mediada por autoanticorpos.

Fonte: Adaptado de CARROLL et al, 2004.

Ig (M, G) – Imunoglobulina (M, G); TCR – receptor de células T; MHC classe II – Complexo de histocompatibilidade principal classe II; C (1, 2b, 4b, 3, 3b, 3a) – componente (1, 2b, 4b, 3, 3b, 3a) do sistema de complemento.

Os neutrófilos tem sido relacionados como importantes na patogênese do LES, apesar de doses elevadas de glicocorticoides poderem influenciar na sua ativação (BOSCH, 2011; WEIDENBUSCH et al, 2017). No processo inflamatório, quando neutrófilos são destruídos liberam “traps” extracelulares contendo DNA e mitocôndrias, os quais são alvos de autoanticorpos no LES. O DNA mitocondrial estimula a produção de IFN- α pelas células dendríticas plasmocitoides (PDC) (WANG et al, 2015; LOOD et al, 2016). Estas células dendríticas encontram-se reduzidas na circulação sanguínea de pacientes com LES, porém se acumulam em seus tecidos (WEIDENBUSCH et al, 2017). Além disso, elas se ligam a imunocomplexos através de receptores TLR3, TLR7 e TLR9. A estimulação de TLR9 inibe a produção de IFN- α induzida por TLR7 em PDCs, consequentemente a ligação de imunocomplexos no receptor TLR7, após a estimulação de TLR9, tem a produção de IFN- α diminuída, sugerindo uma via de competição, criando efetivamente um ciclo de feedback

negativo. As mulheres têm indução mais forte de IFN- α no TLR7, mas não a estimulação de TLR9 em comparação com os homens, conseqüentemente elas apresentam maior produção de IFN- α . Estimulação TLR9 prolongada leva à diminuição da produção de IFN- α em PDCs (BERGHOFER et al, 2007; KWOK et al, 2008).

Os glicocorticóides são a primeira linha de tratamento do LES por suprimirem as PDCs, porém a ativação de TLR7/9 pode induzir uma inibição da ação dos esteróides nas PDCs, acarretando em uma resistência relativa aos esteroides (GUIDUCCI et al, 2010).

As PDCs expressam também a superfamília dos fatores de necrose tumoral (TNF), também conhecido como CD134, CD134L, que demonstraram regular as respostas anormais de células T no LES, associando mecanismos imunes inatos e adaptativos na patogênese da doença (JACQUEMIN et al, 2015).

O sistema de complemento tem grande relevância na patogenia do LES, pois ele contribui para a iniciação do processo inflamatório e dano tecidual, porém a deficiência de alguns de seus fatores podem aumentar o risco de desenvolvimento da doença (TRUEDSSON et al, 2007).

A ativação do sistema de complemento pode ser desencadeado pela interação de C1q com anticorpos formando os imunocomplexos (Via clássica), pela ligação da lecitina ligadora de manose à manose ou N-acetilglucosamina (Via da lecitina) ou pela hidrólise espontânea da ligação tio-éster em C3 (Via alternativa). As vias da Lecitina e alternativa são capazes de discriminar entre patógenos e autoantígenos de acordo com o conceito de padrão de receptores de reconhecimento e constituem parte de uma primeira linha de defesa (TRUEDSSON et al, 2007).

Mutações nos componentes C1q, C2 e C4 da Via clássica do sistema de complemento, favorecem o desenvolvimento do LES. O sistema complemento é crucial para a remoção eficiente de imunocomplexos e o clearance de células apoptóticas, o que, neste caso, aumenta a disponibilidade de autoantígenos (TRUEDSSON et al, 2007; WEIDENBUSCH et al, 2017).

Pacientes com deficiência de C1q ou C4 tem uma incidência de LES igual entre homens e mulheres, sendo que a doença tende a se desenvolver em idades mais novas e o acometimento de vários órgãos juntamente com glomerulonefrite ocorre em cerca de 30% dos casos. Já pacientes com deficiência de C2 mostram uma distribuição sexual semelhante à observada no LES genuíno (7 mulheres: 1 homem) e a doença tende a iniciar mais tarde na vida (TRUEDSSON et al, 2007).

Estudos anteriores evidenciaram também que autoanticorpos em pacientes com deficiência de C2 e LES é diferente quando comparado com indivíduos sem a deficiência, mas com LES. FAN-Hep2+ e anti-SSA/Ro+ foram observados em apenas 25% dos pacientes, enquanto anti-RNP foi encontrado em 45% e anti-dsDNA em apenas 1 paciente (n=12) (PICKERING et al, 2000; TRUEDSSON et al, 2007).

Citocinas, tais como o IFN- γ parecem estar associadas ao desenvolvimento do LES (WEIDENBUSCH et al, 2017). O IFN- γ participa de vários efeitos biológicos associados ao LES, tais como: diferenciação de células B em células plasmáticas produtoras de anticorpos; células B de memória através da regulação positiva do fator de ativação das células B da família TNF (BAFF) e da indução de proliferação de células dendríticas mieloides (MDCs); expressão aumentada do complexo de histocompatibilidade principal II (MHCII), CD86 e CD80; ativação de células T CD8; e supressão de células T regulatórias (BACHER et al, 2013). Outra função do IFN- γ , é que ao se ligar ao receptor CXCL-10 (CXC-quimiocina ligante10, também conhecido como IP-10), em células renais, apresenta uma forte correlação com a atividade renal do LES e, portanto, tem valor como um biomarcador urinário para a nefrite lúpica (WEIDENBUSCH et al, 2017).

O fosfato de esfingosina-1 demonstrou ser um regulador negativo da produção de IFN- α em PDCs por internalização do ILT7 atenuado (transcrito semelhante à imunoglobulina 7). Isso, juntamente com as células dendríticas do sangue e a estimulação do antígeno 2 (BDCA-2), que inibe PDCs pela supressão da sinalização de TLR9, poderia conseqüentemente ser usado para modular a função das PDC no LES (WEIDENBUSCH et al, 2017).

Sabe-se que células TCD4 imaturas, quando são ativadas por antígenos específicos se diferenciam em três tipos diferentes de células TCD4 efectoras: células

T helper tipo 1 (Th1), tipo 2 (Th2) e tipo 17 (Th17), as quais são caracterizadas pela produção de citocinas específicas distintas. As células Th1 produzem principalmente IFN- γ , IL-2 e TNF- α , estas citocinas são responsáveis por desencadear uma imunidade mediada por células. Já as células Th2 liberam IL-4, IL-5 e IL-10, sendo responsáveis pela resposta imune humoral e a consequente produção de anticorpos. E por fim, as células Th17 produzem IL-17 responsável pela ativação da resposta inflamatória. Uma ativação descontrolada de Th1, Th2 e Th17 podem gerar um quadro inflamatório exacerbado nos tecidos alvo. Para evitar a ativação descontrolada, células T chamadas reguladoras (Treg), controlam a ativação de células T efetoras para manutenção da resposta imune e prevenção de autoimunidade e inflamação tecidual (**Figura 3**) (MIYAKE et al, 2011; MARTIN et al 2014).

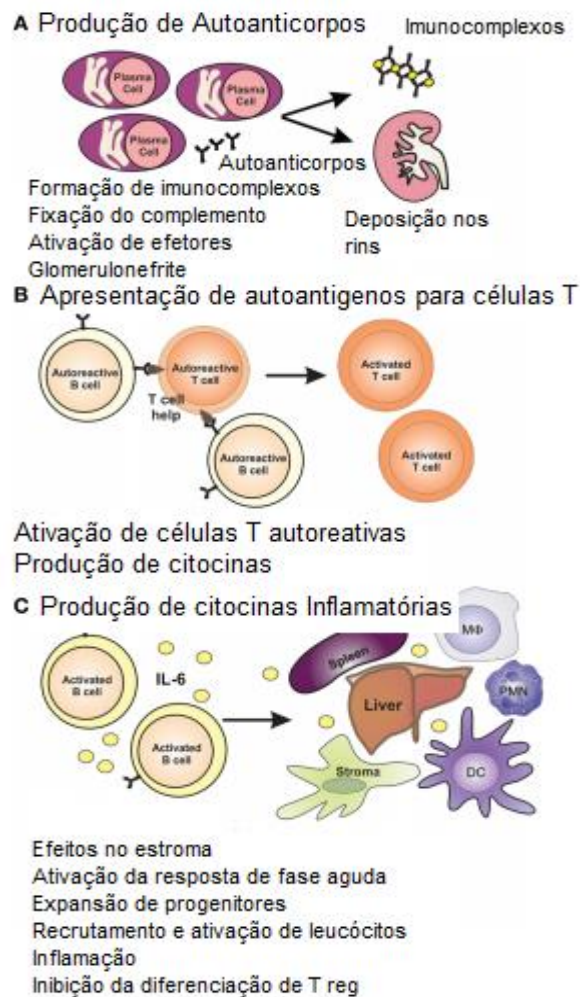


Figura 3 - Papel das células B

Fonte: adaptado CARROLL et al, 2004.

Autoreactive B cell – células B autorreativas; Autoreactive T cell – células T autorreativas; Activeted T cell – célula T ativada; Activeted B cell – célula B ativada; DC – células dendríticas; PMN – polimorfonucleares; M ϕ – macrófagos; Liver – fígado; Spleen – baço; Stroma – estroma.

Estudos sugerem a participação efetiva de células Th1 no LES. Porém, a elevação de citocinas produzidas por Th1 e Th2 é comum em humanos sugerindo que possa haver um complexo envolvimento celular na heterogeneidade de manifestações clínicas e o envolvimento de órgãos (KELLEY e WUTHRICH, 1999; MIYAKE et al, 2011). A IL-12 é produzida por macrófagos e células dendríticas, a qual em conjunto com a IL-18, promove a produção de IFN- γ e leva a polarização de células periféricas em direção a um fenótipo Th1. Miyake et al (2011) evidenciaram que a relação IFN- γ /IL-4 estava aumentada na nefrite lúpica.

Estudos evidenciaram também que uma predominância de citocinas produzidas por Th2 associado a imunocomplexos de IgG4 podem estar associadas a um quadro de glomerulonefrite. A IL-4 é quem direciona a produção de IgG4 pelas células B (WEENING et al, 2004).

A IL-17 é produzida principalmente por células CD4+, CD8+, células T γ / δ e células Th17. Dolff et al (2010) mostraram que na nefrite lúpica células T que expressam IL-17 migram para o rim e podem contribuir para processos inflamatórios. Co-estimulação de CD80 e CD134 em células T com produção de IL-17 estavam aumentadas em pacientes com LES quando comparados com pacientes saudáveis. A presença de células T CD134 + no rim sugere que essas células quando se ligam ao CD134L expresso por células endoteliais migram para o rim e podem contribuir para processos inflamatórios através da secreção de IL-17 (MIYAKE et al 2011). Na nefrite lúpica macrófagos e monócitos são os principais produtores de IL-6, a qual é responsável pela proliferação de células mesangiais renais com ativação da diferenciação de células T no subtipo Th17, além de auxiliarem o fator de crescimento transformador- β (TGF- β) (MANGAN et al, 2006). Segundo Cash et al (2010) a ausência de IL-6, em modelo animal, resultou em diminuição de macrófagos infiltrados no rim, redução da deposição de IgG e C3 e redução de CD4+ e CD8+.

As células Treg são uma população heterogênea de células CD4+/CD8+/CD25+. O Foxp3- formado por células Treg produtoras de IL-10 e células Th3 que produzem TGF- β é responsável pela diferenciação para o subtipo CD4+/CD25+/FoxP3+Treg. As células Foxp3+Treg são importantes na autoimunidade. A expressão do Foxp3 inibe as células T de se diferenciarem em T efetoras pró-inflamatórias Th17. Por outro lado, o TGF- β , juntamente com a IL-6,

promove a diferenciação de células Th17 e suprime a FoxP3, levando a uma redução nas células Treg (MANGAN et al, 2006).

A elevação da IL-10 também ocorre em diferentes condições clínicas associadas ao LES. Porém, ainda não está claro se sua elevação pode auxiliar no desenvolvimento de nefrite. A IL-10 não é uma citocina específica, pois pode ser produzida por células Th1, Th2, Th17 e Treg, porém, sua superexpressão em pacientes com LES pode sugerir ativação de células Treg (MIYAKE et al, 2011).

1.1.3. Diagnóstico

O diagnóstico do LES é bastante complexo, visto que seus sinais e sintomas clínicos inespecíficos (febre, fadiga, artralgias, dentre outros) são comuns a várias outras patologias, podendo ser associados com doenças infecciosas, inflamatórias e até mesmo outras doenças autoimunes (IGHE et al, 2015).

O exame FAN-Hep2 é utilizado como teste de triagem. Apesar de apresentar baixa especificidade, quando associado a uma clínica sugestiva de LES o diagnóstico torna-se bastante provável. A presença de FAN-Hep2+ é bastante comum no LES como demonstrado na Espanha, na Dinamarca e também no Brasil com 95,6%, 100% e 100% de positividade, respectivamente. Os títulos encontrados confirmam que pacientes com LES, diferentemente de indivíduos normais, tendem a apresentar o FAN-Hep2 em títulos de moderados (1/320) a elevados (>1/640) (NAKASHIMA et al, 2011). Segundo a Portaria nº100/2013 casos com pesquisa de FAN-Hep2-, porém com lesões cutâneas fotossensíveis, recomenda-se a realização da pesquisa de anticorpos anti-SSA/Ro e anti-SSB/La. Anticorpos anti-DNA nativo e anticorpos anti-Sm são considerados testes específicos para a identificação do LES, mas têm baixa sensibilidade, o que pode gerar resultados falso negativos. Além disso, anticorpos anti-SSA/Ro, anti-SSB/La e níveis séricos de componentes do complemento podem auxiliar no diagnóstico e acompanhamento da doença (COSTA e COIMBRA, 2014).

Além disso, na avaliação clínica o médico solicitará outros exames que podem auxiliar no diagnóstico ou no acompanhamento do LES, tais como: hemograma

completo com contagem de plaquetas; contagem de reticulócitos; teste de Coombs direto; velocidade de hemossedimentação (VHS); proteína C reativa (PCR); eletroforese de proteínas; aspartato-aminotransferase (AST); alanina-aminotransferase (ALT); fosfatase alcalina; bilirrubinas total e frações; desidrogenase láctica (LDH); ureia e creatinina; eletrólitos (cálcio, fósforo, sódio, potássio e cloro); exame qualitativo de urina (EQU); complementos (CH50, C3 e C4); albumina sérica; proteinúria de 24 horas; VDRL; e avaliação de autoanticorpos (FAN-Hep2, anti-DNA nativo, anti-Sm, anticardiolipina IgG e IgM, anticoagulante lúpico, anti-La/SSB, anti-Ro/SSA e anti-RNP) (KUHN et al, 2015).

A avaliação do hemograma é de fundamental importância no acompanhamento do LES, uma vez que é comum esses pacientes apresentarem quadros de anemia (Hemoglobina <12g/dL em mulheres e <13,5g/dL em homens e hematócrito inferior a 35%), redução de eritrócitos ($3,9 \times 10^6$ e $4,3 \times 10^6$ em mulheres e homens respectivamente) associado a reticulocitose, leucopenia (global de leucócitos < 4×10^3 /dL) com linfopenia e/ ou neutropenia, < $1,5 \times 10^3$ e 1×10^3 /dL, respectivamente. Porém a leucopenia pode estar associada ao tratamento e, além disso, a presença de quadros infecciosos podem gerar um quadro de leucocitose ($>10 \times 10^3$ /dL) decorrente principalmente da elevação de neutrófilos (BASHAL et al, 2013; FAYYAZ et al, 2015).

Quadros de trombocitopenia ($<100 \times 10^3$ /dL) também são comuns em pacientes com LES e em geral estão associados a atividade da doença, além de ser um fator de risco para esses pacientes (KUHN et al, 2015).

Diante disso recomenda-se que o diagnóstico de pacientes com LES seja feito através de critérios de classificação dos pacientes de acordo com o *American College of Rheumatology* (ACR) (**Anexo 1**), o qual é estabelecido a partir da presença de pelo menos 4 dos 11 critérios de classificação, em qualquer momento da vida dos pacientes, propostos pelo ACR em 1982 e revisados em 1997. Os critérios são: eritema malar, lesões discoides, fotossensibilidade, úlceras orais ou nasofaringeanas, pleurite ou pericardite, artrite (não erosiva, com 2 ou mais articulações com dor, inchaço ou efusão), comprometimento renal (proteinúria persistente e cilindros urinários), alterações hematológicas (anemia hemolítica, leucopenia, linfopenia e plaquetopenia), alterações neurológicas, alterações imunológicas e presença de

anticorpos antinucleares. Esses critérios apresentam uma sensibilidade de 83% e uma especificidade de 96% (HOCHBERG et al, 1997; BORBA et al, 2008).

Petri et al (2012) propôs o *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) (**Anexo 2**), no qual além dos critérios utilizados no ACR foram incluídos critérios baseados nos sinais e sintomas clínicos, tais como: alopecia não cicatricial, acometimento articular (rigidez matinal das articulações por mais de 30 minutos), hematúria, sintomas neurológicos (mielite, neuropatia cranial ou periférica, estado confusional agudo), alterações imunológicas (redução de componentes do sistema de complemento, Coombs direto positivo e anti- β glicoproteína). O diagnóstico baseado no SLICC é feito com a presença de 4 ou mais desses critérios, ou biópsia renal com nefrite lúpica e FAN-Hep2+ ou anti-dsDNA+. Esses critérios possuem 97% e 84% de sensibilidade e especificidade, respectivamente (KUHN et al, 2015; VASQUEZ-CANIZARES, 2017).

Após diagnosticar o LES a equipe médica monitora a evolução do quadro clínico através da classificação da atividade da doença, esse monitoramento é útil tanto para a avaliação do tratamento e consequente remissão da doença quanto para a pesquisa clínica. A atividade é avaliada de acordo com o índice SLEDAI-2k (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index 2K*), o qual pontua as alterações clínicas e laboratoriais dos pacientes durante a consulta médica (**Anexo 3**) (TOUMA et al, 2010; MIKDASHI e NIVED, 2015).

O SLEDAI-2k é um questionário feito pelo médico no qual ele avalia e pontua as manifestações apresentadas pelo paciente, ele consiste em 24 diferentes manifestações que são pontuadas de 1 a 8, sendo que as alterações neurológicas e vasculares recebem 8 pontos cada, alterações musculoesqueléticas e renais 4 pontos cada, manifestações cutâneas e imunológicas 2 pontos e febre, leucopenia e trombocitopenia 1. A pontuação pode variar de 0 (paciente não apresenta nenhuma manifestação) a 105 (soma da pontuação de todos os critérios) em um período de 30 dias (BOMBARDIER et al, 1992; TOUMA et al, 2010). De acordo com essa pontuação os pacientes são classificados em LES baixa atividade (≤ 4) ou LES moderada/alta atividade (>4) (MORAND e MOSCA, 2017).

1.1.4 Tratamento:

Como o LES é uma doença crônica e autoimune, e ainda não apresenta cura, o paciente deve receber orientações sobre a evolução da doença e cuidados. O tratamento, tem como objetivo garantir uma boa qualidade de vida e um bom prognóstico da doença. O tratamento farmacológico depende da atividade da doença e do órgão acometido. Os principais fármacos utilizados para o tratamento são: corticoides (prednisona e hidrocortisona), imunossupressores (ciclofosfamida, metotrexato e azatioprina) e antimaláricos (hidroxicloroquina e difosfato de cloroquina). Os antimaláricos são utilizados com o objetivo de reduzir a atividade da doença, evitar o risco de trombose e melhorar o quadro articular (COSTA e COIMBRA, 2014).

1.2 Micropartículas:

O processo de ativação celular e apoptose produzem vesículas extracelulares, que dependendo do tamanho são chamadas de exossomos, microvesículas ou corpos apoptóticos. Em geral as microvesículas apresentam cerca de 0,1 a 1µm de diâmetro, já os corpos apoptóticos podem apresentar o mesmo tamanho, porém dependendo da fase em que ocorre a apoptose eles podem ser um pouco maiores (ZIRNGIBL et al, 2015). As microvesículas, foram classificadas como Micropartículas (MPs) em 1967 por Peter Wolf, e diferenciadas dos corpos apoptóticos e exossomos por seu mecanismo de liberação, tamanho e expressão de marcadores de superfície, sendo que as MPs de maior relevância científica apresentam um tamanho variando de 7-9µm (NOMURA e SHIMIZU, 2015; RASMUSSEN e JACOBSEN, 2018).

Os exossomos variam de 50-100nm e tem origem intracelular e mecanismos de expressão extracelular. São formados por exocitose através da fusão de corpos multivesiculares que se ligam a membrana plasmática. Uma diferença entre exossomos e MPs é que os primeiros são formados internamente, enquanto as MPs se originam na superfície celular. Já os corpos apoptóticos são muito maiores do que as MPs ou exossomos, sendo grandes fragmentos ou restos de células após

apoptose. A linha divisória entre MPs e corpos apoptóticos não é clara porque essas estruturas podem ter componentes em comum e ambas podem se originar durante os processos de morte celular (BOBRIE et al, 2011; DYE et al, 2013).

As MPs e os corpos apoptóticos facilitam a remoção de restos celulares, uma vez que o tamanho facilita a fagocitose pelas células de defesa reduzindo as atividades pró-inflamatórias ou pró-trombóticas que a morte celular pode gerar. Porém, devido ao menor tamanho das MPs, os fagócitos tendem a fagocitar primeiramente os corpos apoptóticos e conseqüentemente as MPs conseguem transportar substâncias biotivas para outros locais. Durante a infecção viral, por exemplo, as MPs geradas poderiam transportar uma carga de material celular e viral para ativar a imunidade inata do hospedeiro; tal mecanismo, se excessivo ou desregulado, pode predispor à autoimunidade (DYE et al, 2013).

As MPs são pequenas vesículas ligadas externamente à membrana celular, as quais podem exercer diferentes atividades biológicas incluindo a participação em doenças autoimunes. Elas se desprendem das células por brotamento exocítico durante a ativação e/ou apoptose. Inicialmente as MPs foram consideradas detritos sem importância, porém hoje sabe-se que elas podem estar relacionadas com inúmeros processos fisiológicos, as quais podem facilitar a comunicação intracelular induzindo sinalização celular em processos imunológicos. As MPs podem ser originadas de vários tipos celulares, além disso elas podem incluir várias outras moléculas, como por exemplo, DNA, RNA, proteínas nucleares, fatores de crescimento e citocinas (COCUCCI et al, 2009; MAUSE e WEBER, 2010). Além de seu papel na sinalização, as MPs podem ser o gatilho da formação de imunocomplexos, provocando ativação do sistema de complemento. Devido a sua variedade de constituintes, elas podem gerar processos como inflamação, coagulação, ativação de células endoteliais, apresentação de antígenos e apoptose entre muitos outros (PISETSKY et al, 2012).

As MPs com ação imunológica, em geral são divididas em derivadas de plaquetas e derivadas de leucócitos, porém qualquer outro tipo celular pode produzir MPs e acredita-se que todas são biologicamente ativas. As MPs derivadas de plaquetas, em geral são as mais abundante no sangue e resultam principalmente da ativação de plaquetas, embora a derivação de megacariócitos também seja possível,

essas MPs podem promover trombose, gerando doenças cardiovasculares, incluindo casos decorrentes de doenças autoimunes. Já as MPs de leucócitos também podem induzir quadros de inflamação e, potencialmente, autoimunidade (DYE et al, 2013).

Como as MPs podem ser originadas de diferentes tipos celulares elas apresentam diferentes tipos de Antígenos de superfície, como mostrado na **Tabela 1**:

Tabela 1 - Antígenos de superfície que caracterizam a origem das Micropartículas.

Antígenos de superfície	
Origem das Micropartículas	Antígeno
Plaquetária	CD31, CD41, CD42a, CD42b, CD41, CD61, CD62P, CD63
Endotelial	CD31, CD51, CD54, CD62E, CD105, CD106, CD144, CD146
Monocítica	CD14
Linfocítica	CD4, CD8, CD20

Fonte: adaptado de NOMURA et al, 2015; FRANÇA et al, 2015.

Embora quaisquer linhagens celulares possam formar MPs, as MPs de plaquetas e eritrócitos são as mais comuns no sangue de indivíduos saudáveis, sendo que as MPs derivadas de plaquetas representam a maioria (ARRAUD et al, 2014, 2015). No LES observa-se uma ativação de plaquetas, leucócitos e células endoteliais e a geração de MPs derivadas dessas células (CROOKSTON et al, 2013). A membrana das MPs é carregada negativamente o que permite a ligação de fatores da coagulação, incluindo fator tecidual, e retém marcadores antigênicos membranosos da célula parental o que pode ser usado para identificar a origem celular específica (DISTLER et al, 2006).

MPs de pacientes AR e LES apresentam em sua maioria DNA, histonas e HMGB1, essas moléculas apresentam atividades que podem promover efeitos imunológicos e vasculares inespecíficos, bem como a geração de autoanticorpos específicos. O DNA é facilmente ligado ao anticorpo anti-DNA, devido à expressão da superfície ou à acessibilidade dos locais internos (PISETSKY et al, 2012).

Estudos vem mostrando que as MPs participam da comunicação entre células facilitando a sinalização e a transferência de proteínas entre as células, aumentando tanto a mediação direta célula-célula quanto o mecanismo de comunicação através de citocinas. Ativação celular por MPs foram relatadas em LES, síndrome de Sjögren's, artrite inflamatória, trombocitopenia imune, púrpura trombocitopenica

trombótica, vasculite e síndrome do antifosfolípide (DISTLER et al, 2006; OWENS e MACKMAN, 2011; CROOKSTON et al, 2013).

O LES neuropsiquiátrico e o LES em atividade foram associados com ativação de células endoteliais imunomediadas, aumento da ativação e agregação plaquetária e trombogênese (ZACCAGNI et al, 2004; CROOKSTON et al 2013).

Durante este processo de destruição celular e consequente formação de MPs, a assimetria da membrana é perdida expondo Fosfatidilserina (PS) na superfície da MP (MOREL et al, 2011). A PS pode interagir com fatores da coagulação, sugerindo que as MPs que expressam PS podem participar de eventos trombóticos (OWENS et al, 2011). Além disso, o reconhecimento de PS por lactaderina ou receptores de tirosina-quinase permitem a rápida depuração das MPs da circulação (HAPPONEN et al, 2016).

No LES, as MPs que expressam PS expõe autoantígenos que são reconhecidos por autoanticorpos, formando IC contendo MP (FORTIN et al, 2016).

As plaquetas de pacientes com LES exibem níveis aumentados do ligante CD40 solúvel, P-selectina e tromboxano (BOILARD et al, 2012; FORTIN et al, 2016). A anexina V é uma proteína que se liga à PS com alta afinidade. Sondas fluorescentes conjugadas com anexina V são utilizadas na identificação de MPs em fluidos biológicos. Níveis elevados de anexina V+ MPs+ IC correlacionam-se com concentrações de autoanticorpos e complemento (NIELSEN et al, 2012).

No LES moderada/alta atividade MPs endoteliais estão relacionadas com disfunção endotelial. Parker et al (2014) relatam a melhoria no controle do LES com supressão da inflamação após redução da presença de MPs endoteliais e observaram melhora no quadro de disfunção endotelial, o que sugere que o controle da atividade inflamatória da doença contribuiria para reduzir o risco cardiovascular ou o desenvolvimento de aterosclerose prematura no LES (MCCARTHY et al, 2016).

MPs de origem endotelial (anexina V+/CD31+/CD45-) presentes em pacientes com LES aumentam a expressão de moléculas de superfície co-estimulatórias e a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IFN- γ por células dendríticas plasmocitoides derivadas do sangue e dendríticas mielóides (DIEKER et al, 2016).

Esta via de ativação pode estar associada a outros distúrbios inflamatórios adicionais que sugerem que Micropartículas endoteliais, possam ser importantes como novos alvos terapêuticos imunomoduladores no LES (DIEKER et al, 2016; MCCARTHY et al, 2016).

Atualmente estudos utilizando citometria de fluxo mostram alterações na quantificação e origem celular de MPs originadas de células ativadas CD4+, CD8+, CD14+, CD20+, CD42a+, CD54+ e CD61+ que circulam em pacientes com LES, porém, como a citometria permite a marcação de proteínas específicas, a sua capacidade de análise se torna reduzida e dependente da disponibilidade de anticorpos específicos (NIELSEN et al, 2012; ULLAL et al, 2011).

Neste estudo tentou-se avaliar o papel das MPs na patogênese do LES diferenciando sua associação com AR e ES, uma vez que as MPs apresentam propriedades estruturais e funcionais únicas, que sugerem um papel central na patogênese de doenças autoimunes, assim como a utilidade das MPs como biomarcadores para mapear o curso da doença, incluindo complicações.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos recentes vem demonstrando que Micropartículas exercem influência no perfil de resposta imunológica e que estas encontram-se aumentadas em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (CROOKSTON et al, 2013; FORTIN et al, 2016; MOBARREZ et al, 2016). Sabe-se também que as Micropartículas estão associadas a processos inflamatórios e que pacientes com LES em moderada/alta atividade tendem a apresentar um quadro inflamatório mais acentuado quando comparado com pacientes com LES com baixa atividade. Diante disso, o aumento de Micropartículas e a sua origem celular podem sugerir uma influência significativa no prognóstico da doença. Esse estudo tem como objetivo caracterizar Micropartículas de pacientes com LES e especificar o perfil de ativação por Micropartículas autólogas nas células mononucleares desses pacientes visando contribuir para um melhor conhecimento do papel dessas na modulação da resposta imune no Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Este estudo apresenta uma importância significativa devido ao fato de que até o momento, não existem marcadores específicos que possam ser usados no diagnóstico e prognóstico do Lúpus.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a origem das Micropartículas de pacientes com LES e a sua influência na produção de citocinas por Células Mononucleares de Sangue Periférico a fim de identificar uma possível associação delas com o desenvolvimento e prognóstico do LES.

3.2. Objetivos Específicos

- Quantificar Micropartículas nas pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico;
- Avaliar o perfil de ativação, após estímulo, de Células Mononucleares do Sangue Periférico de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico por Micropartículas autólogas;
- Avaliar a produção de citocinas IFN- γ e IL-10.

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1. Normas Éticas:

O projeto de pesquisa intitulado “Lúpus Eritematoso Sistêmico: aspectos hematológicos e imunológicos” foi analisado e aprovado em 27 de junho de 2012, pela Comissão de Ética e Pesquisa da UFMG – COEP/UFMG, sob o número do protocolo CAAE 01928412.8.0000.5149 (**Anexo 4**) e em 4/07/2016 pelo Hospital das Clínicas sob o número 061/16 (**Anexo 5**).

4.2. Seleção de Voluntários:

Os indivíduos participantes do estudo foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, durante a consulta médica nos Ambulatórios de Reumatologia do Hospital Bias Fortes pertencente ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais e do Centro de Especialidades Médicas da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte. Todos os participantes foram esclarecidos da natureza do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 6**), autorizando a coleta de sangue e o uso de informações constantes no prontuário médico.

A população do estudo foi dividida em quatro grupos:

- Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico de baixa atividade (LESABA) (n=7);
- Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico de moderada/alta atividade (LESAMA) (n=8);
- Pacientes com Outras Doenças Autoimunes (ODA):
 - ✓ Artrite Reumatóide (AR) (n=3);
 - ✓ Esclerodermia Sistêmica (ES) (n=2);

- Indivíduos saudáveis (CT) (n=5).

As pacientes com LES foram distribuídos nos grupos LESABA e LESAMA de acordo com escore de SLEDAI-2k modificado realizado pela equipe médica durante a consulta, considerando SLEDAI-2k \leq 4 para o grupo LESABA e SLEDAI-2k $>$ 4 para o grupo LESAMA (MORAND et al, 2017).

4.2.1. Critérios de Inclusão

- LESABA:

- ✓ Indivíduos do sexo feminino com LES SLEDAI-2k \leq 4;
- ✓ Idade entre 18-75 anos;
- ✓ Dose máxima de prednisona de 10mg;
- ✓ HIV negativo;
- ✓ Prontuário atualizado e exames laboratoriais recentes.

- LESAMA:

- ✓ Indivíduos do sexo feminino com LES SLEDAI-2k $>$ 4;
- ✓ Idade entre 18-75 anos;
- ✓ Dose máxima de prednisona de 10mg;
- ✓ HIV negativo;
- ✓ Prontuário atualizado e exames laboratoriais recentes.

- ODA:

- ✓ Indivíduos do sexo feminino diagnosticadas com AR ou ES;
- ✓ Idade entre 18-75 anos;
- ✓ Dose máxima de prednisona de 10mg;
- ✓ HIV negativo;
- ✓ Prontuário atualizado e exames laboratoriais recentes.

- CT:

- ✓ Indivíduos do sexo feminino;
- ✓ Idade entre 18-75 anos;
- ✓ HIV negativo;
- ✓ Não portadores de doenças autoimunes, infecciosas ou inflamatórias.

4.2.2 Critérios de Exclusão

- LESABA e LESAMA:

- ✓ Indivíduos do sexo masculino;
- ✓ Quadro de doença infecciosa, inflamatória ou autoimune;
- ✓ HIV positivo;
- ✓ Gestante;
- ✓ Pulsoterapia com imunossupressor;
- ✓ Sem prontuário ou exames laboratoriais recentes.

- ODA:

- ✓ Indivíduos do sexo masculino;
- ✓ Indivíduos com LES ou outra doença autoimune que não AR ou ES;
- ✓ Quadro de doença infecciosa, inflamatória ou autoimune;
- ✓ HIV positivo;
- ✓ Gestante;
- ✓ Pulsoterapia com imunossupressor;
- ✓ Sem prontuário ou exames laboratoriais recentes.

- CT:

- ✓ Indivíduos do sexo masculino;
- ✓ Quadro de doença infecciosa, inflamatória ou autoimune observado nos últimos 30 dias (autorrelato);
- ✓ HIV positivo;
- ✓ Gestantes;
- ✓ Uso de imunossupressor.

4.3. Estudos Laboratoriais

4.3.1. Obtenção das Amostras de Sangue

Foram coletados 16mL de sangue periférico por punção venosa no antebraço em tubos estéreis do sistema Vacuette do Brasil (BD Biosciences) contendo heparina e 4mL de sangue em tubo contendo citrato de sódio (BD Biosciences).

Posteriormente as amostras de sangue foram encaminhadas ao Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais para o desenvolvimento do protocolo experimental.

4.3.2. Purificação de Células Mononucleares do Sangue Periférico

A purificação de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foi realizada com a amostra de sangue coletado com heparina. Em fluxo laminar o sangue foi transferido para tubos Falcon (Falcon corning USA) de 15mL contendo Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co, EUA, densidade 1,077g/mL) na proporção de 1/3 de Ficoll para 2/3 de sangue. Em seguida os tubos foram centrifugados a 550g por 45 minutos a 18°C. Após a centrifugação, o anel de células formado entre o Ficoll-Hypaque e o plasma foi coletado com auxílio de pipeta Pasteur estéril e transferido para um tubo Falcon de 15mL e o volume foi completado com RPMI-1640 (Sigma-Aldrich USA) gelado. As células foram centrifugadas a 370g por 7 minutos a 4°C. Posteriormente o sobrenadante foi descartado, o pellet foi ressuscitado e o volume foi completado novamente com RPMI-1640 sendo repetido esse processo por mais 2x.

Após a última lavagem, o pellet foi ressuscitado em 1mL de RPMI-1640 do qual foi retirado 10µL da suspensão e adicionado 90µL de Azul de Tripán (Corning™ BD Biosciences) para a quantificação das células em câmara hemocitométrica de Neubauer. A concentração celular foi ajustada para $1,5 \times 10^6$ células/mL. Foram cultivados 3 poços com $1,5 \times 10^6$ cada em placas de 24 poços para cada paciente, em seguida as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 12h para a estimulação das células com as MPs.

4.3.3. Purificação de Micropartículas

Para a extração de MPs foi coletado 4mL de sangue periférico em tubo contendo anticoagulante citrato de sódio. A amostra foi centrifugada a 1500g por 15 minutos a 23°C para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). Posteriormente o PPP foi transferido para eppendorfs e centrifugado novamente a 13000g por 5 minutos a 23°C, obtendo-se assim o plasma livre de plaquetas (PLP). O PLP foi aliqotado em eppendorfs e armazenado em freezer a -20°C por 12h.

4.3.4. Quantificação e Caracterização de Micropartículas

As amostras de PLP congeladas a -20°C foram descongeladas e aliqotadas em eppendorfs:

- 2 eppendorfs contendo 100µL de PLP para quantificação e identificação da origem das MPs utilizando, a citometria de fluxo (LSRFortessa™ BD Biosciences);
- 1 eppendorf contendo 300µL de PLP para estímulo da CMSP.

Aos eppendorfs foi adicionado tampão citrato/heparina (300µL de tampão em cada eppendorf contendo 100µL de PLP e 900µL de tampão no eppendorf contendo 300µL de plasma) para a obtenção das MPs. Essa preparação foi centrifugada a 15000g por 90 minutos a 15°C. Terminada a centrifugação o sobrenadante foi removido e o pellet contendo MPs para o estímulo da cultura foi ressuspendido em 300µL RPMI-1640 gelado e armazenado em banho de gelo. Já os pellets de MPs para a quantificação foram ressuspendidos em 100µL de tampão de anexina cada. Em seguida foram adicionados os anticorpos para a quantificação e a identificação da origem das MPs (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Anticorpos utilizados na marcação de MPs

Anticorpo	Fluorocromo	Volume	Fabricante	Especificidade
Anexina	FitC	2,5µL	BDBiosciences	Micropartículas
CD4	PECy-5	2,5µL	BDBiosciences	Linfócito T CD4
CD8	APC	5µL	BDBiosciences	Linfócito T CD8
CD14	BV605	2,5µL	BDBiosciences	Monócito
CD20	V450	5µL	BDBiosciences	Linfócito B
CD42a	PE	2,5µL	BDBiosciences	Plaqueta
CD54	APC	5µL	Bio Albra	Célula Endotelial
CD61	PE	2,5µL	BDBiosciences	Plaqueta

FitC: *Fluorescein-5-isothiocyanate*; PECy-5: Ficoeritrina-Cianina 5; APC: Alofococianina; BV605: *Brilliant™ Violet*; V450: *Horizon™ 450*; PE: Ficoeritrina.

Após a adição dos anticorpos, os tubos foram incubados por 30 minutos a 4°C e protegidos da luz. Posteriormente, adicionou-se mais 300µL de tampão de anexina a cada tubo (totalizando um volume total de 400µL). Em seguida, os tubos foram levados ao Citometro de Fluxo (LSRFortessa™ BD Biosciences) onde a amostra foi aspirada em uma velocidade de 60µL/s durante 60 segundos em alta velocidade para a quantificação e identificação das MPs.

O número de MPs/µL de plasma foi calculado de acordo com a seguinte fórmula, segundo Campos et al (2010):

$$\text{MPs}/\mu\text{L} = (\text{N} \times 400) / (60 \times 100)$$

Onde N é o número de eventos adquiridos no gate selecionado das MPs, 400 é o volume total em cada tubo antes da fenotipagem, 60 é o volume de amostra analisada durante a fenotipagem e 100 é o volume PLP inicial (CAMPOS et al, 2010).

Depois de quantificadas as MPs, calculou-se o volume da amostra (ependorf contendo as MPs ressuspendidas em 300µL de RPMI-1640) equivalente a 50000 MPs para uso na estimulação de CMSP autólogas. Incubou-se por mais 48h a 37°C e 5% de CO₂.

4.3.5. Cultivo de Células Mononucleares do Sangue Periférico

As CMSP, ajustadas a 1,5x10⁶ células/mL de RPMI-1640, foram distribuídas em placas de cultivo de 24 poços (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA). As

células foram estimuladas com 50000 MPs autólogas, adicionadas 12h após o início do cultivo, na ausência de MPs (controle) e como controle positivo utilizou-se o mitógeno fitohemaglutinina (*Phytohemagglutinin* – PHA – Sigma-Aldrich) na concentração final de 3µg/mL. A placa foi incubada em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 48h.

4.3.6. Marcação das Células Mononucleares de Sangue Periférico

Faltando 4 horas para o término do tempo de incubação foi adicionado aos poços contendo CMSP em cultivo 1µL/poço de Brefeldina (BD Golgi Plug™, BD Biosciences). Após esse tempo a placa de 24 poços contendo as células foi centrifugada a 430g a 4°C por 10 minutos e em seguida, colocada em banho de gelo. O sobrenadante foi descartado e as células coletadas para tubos de poliestireno de 5mL, cada poço foi lavado 3 vezes com 500µL PBS (*Phosphate Buffered Saline*) gelado. A cada tubo foi adicionado 1mL de PBS-W (*Phosphate Buffered Saline – Wash*) e a suspensão foi homogeneizada em vortex. Em seguida os tubos foram centrifugados por 7 minutos a 400g e 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e adicionou-se aos tubos os anticorpos monoclonais marcados com fluorocromo de acordo com a **Tabela 3**:

Tabela 3 - Anticorpos utilizados para imunofenotipagem

Anticorpo	Fluorocromo	Volume	Fabricante	Especificidade
CD4	PECy-5	2µL	BDBiosciences	Linfócitos T
CD8	APC	4µL	BDBiosciences	Linfócitos T
CD14	FitC	4µL	BDBiosciences	Monócitos
CD19	PE	4µL	BDBiosciences	Linfócitos B

PECy-5: Ficoeritrina-Cianina 5; APC: Alofococianina; FitC: *Fluorescein-5-isothiocyanate*; PE: Ficoeritrina.

Os tubos foram incubados por 30 minutos a 23°C e protegidos da luz.

Após a incubação, a cada tubo, foi adicionado 1mL de PBS-W, os quais foram homogeneizados em vortex e centrifugados a 400g por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a cada tubo foi adicionado 500µL de PBS-W e 3mL de PBS-P (*Phosphate Buffered Saline – Perm*), homogeneizados 10 vezes por inversão

e incubados por 10 minutos a 4°C protegidos da luz. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 400g por 7 minutos a 4°C.

Novamente o sobrenadante foi descartado e ao sedimento foram adicionados os anticorpos anti-citocinas, de acordo com o **Tabela 4**:

Tabela 4 - Anticorpos anti-citocinas

Anticorpo	Fluorocromo	Volume	Fabricante
IFN- γ	PE	3 μ L	BD Biosciences
IL-10	PE	3 μ L	BD Biosciences

PE: Ficoeritrina.

Os tubos foram, novamente, incubados por 30 minutos a 4°C e protegidos da luz.

Posteriormente a cada tubo foi adicionado 2mL de PBS-P e a suspensão celular foi centrifugada a 400g por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi adicionado 2mL de PBS-W, sendo novamente centrifugado a 400g por 7 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi adicionado 300 μ L de solução fixadora *Macs Facs Fix* (MFF) para posterior leitura em citometro de fluxo.

As amostras foram levadas ao citometro de fluxo LSR Fortessa™ BD Biosciences, sendo adquiridos 100000 eventos por tubo.

4.4. Aquisição de dados:

4.4.1. Quantificação de Micropartículas:

A análise da leitura obtida das MPs foi realizada através do FlowJo™ v10. O gate selecionado da população de MPs foi evidenciada através do gráfico tamanho (FSC) por Anexina+, conforme mostrado na **Figura 4**:

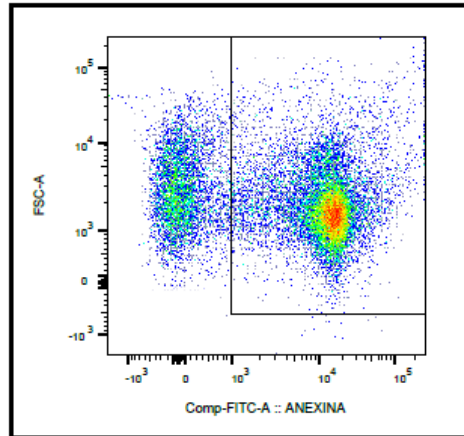


Figura 4 - Gate de Micropartículas – Tamanho x Anexina +.
FSC: *Forward Scatter* (tamanho); FitC: *Fluorescein-5-isothiocyanate*.

A partir da marcação de Anexina (**Figura 4**) foi obtido a população de MPs derivadas de linfócitos (CD4+, CD8+ e CD20+), monócitos (CD14+), endotélio (CD54+) e plaquetas (CD42+ e CD61+) (**Figura 5**).

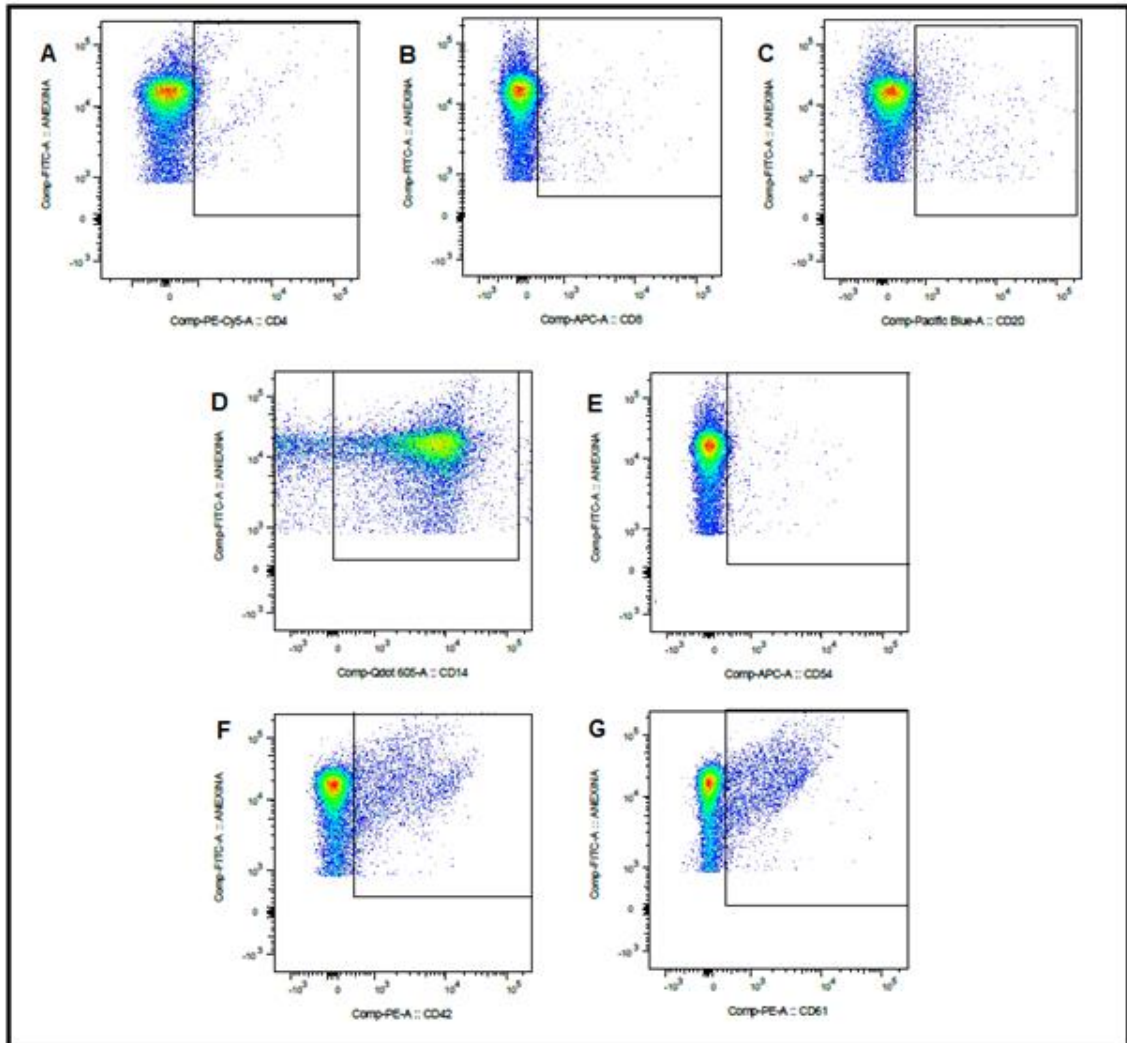


Figura 5 - Gate de Micropartículas provenientes de CD4(A), CD8(B), CD20(C), CD14(D), CD54(E), CD42(F) e CD61(G).

FitC: *Fluorescein-5-isothiocyanate*; PECy-5: Ficoeritrina-Cianina 5; APC: Alociocianina; BV605: *Brilliant™ Violet*; V450: *Horizon™ 450*; PE: Ficoeritrina.

4.4.2. Análise de Células Mononucleares de Sangue Periférico:

As leituras das CMSP marcadas foram realizadas no citometro de fluxo LSR Fortessa™ BD através do software BD FACSDiva Software™ e foram adquiridos cerca de 100000 eventos, sendo a análise realizada através do FlowJo™ v10.

A aquisição da população de linfócitos foi feita em gráfico tamanho (FSC) por granulidade (SSC), onde foi selecionado o gate de interesse (**Figura 6**).

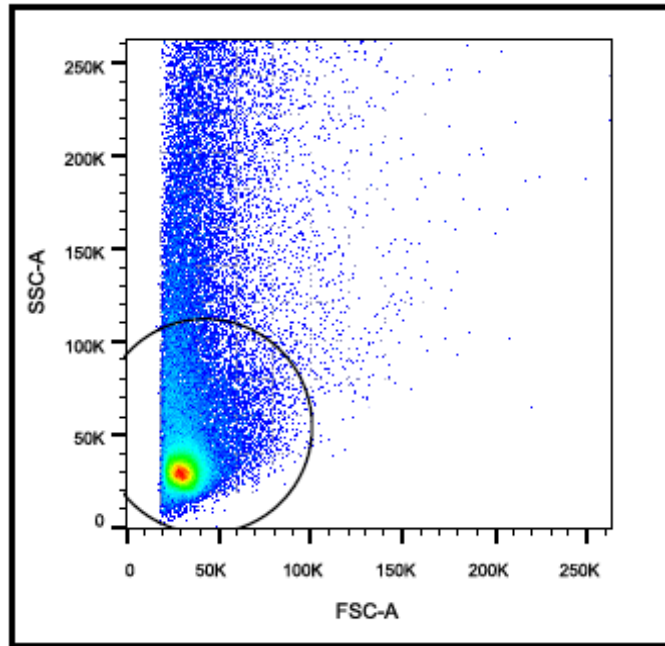


Figura 6- Gate de Linfócitos – Tamanho (FSC) X Granulosidade (SSC)

A partir do gate selecionado foram obtidos os dot-plots das populações de interesse: linfócitos T CD4+ e T CD8+, linfócitos B CD19+ e monócitos CD14+, conforme a figura abaixo (**Figura 7**):

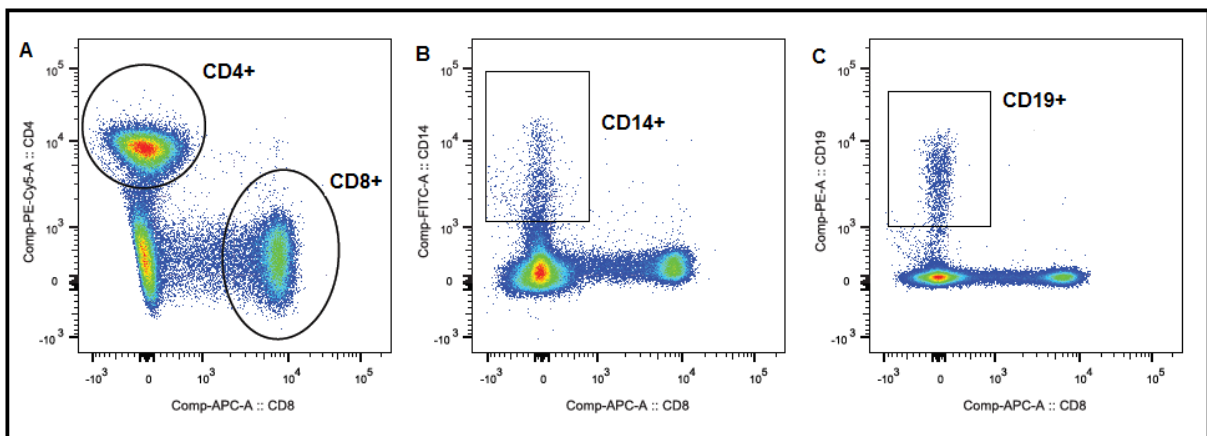


Figura 7 - Dot-plot das populações de CD4+(A), CD8+(A), CD14+(B) e CD19+(C).

FitC: *Fluorescein-5-isothiocyanate*; PECy-5: Ficoeritrina-Cianina 5; APC: Alofocianina; PE: Ficoeritrina.

Foi avaliado a produção de citocinas IL-10 e IFN- γ pelas de células CD4+ e CD8+ (**Figuras 8 e 9**).

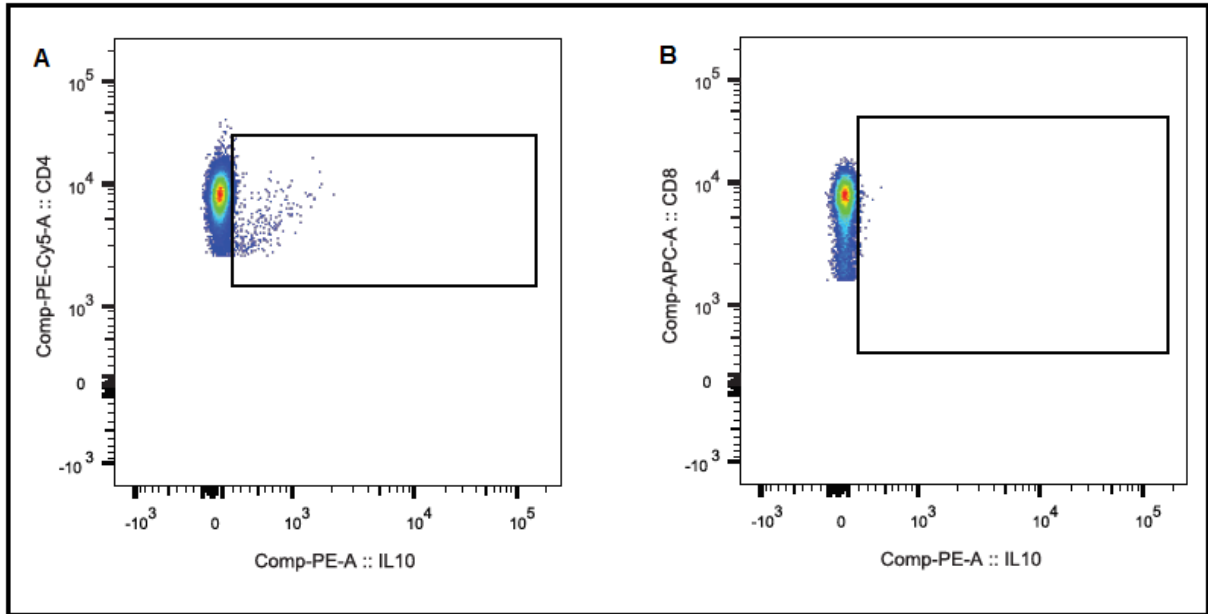


Figura 8 - Dot-plot das populações de CD4(A) e CD8(B) produtoras de IL-10.
 PECy-5: Ficoeritrina-Cianina 5; APC: Aloficocianina; PE: Ficoeritrina.

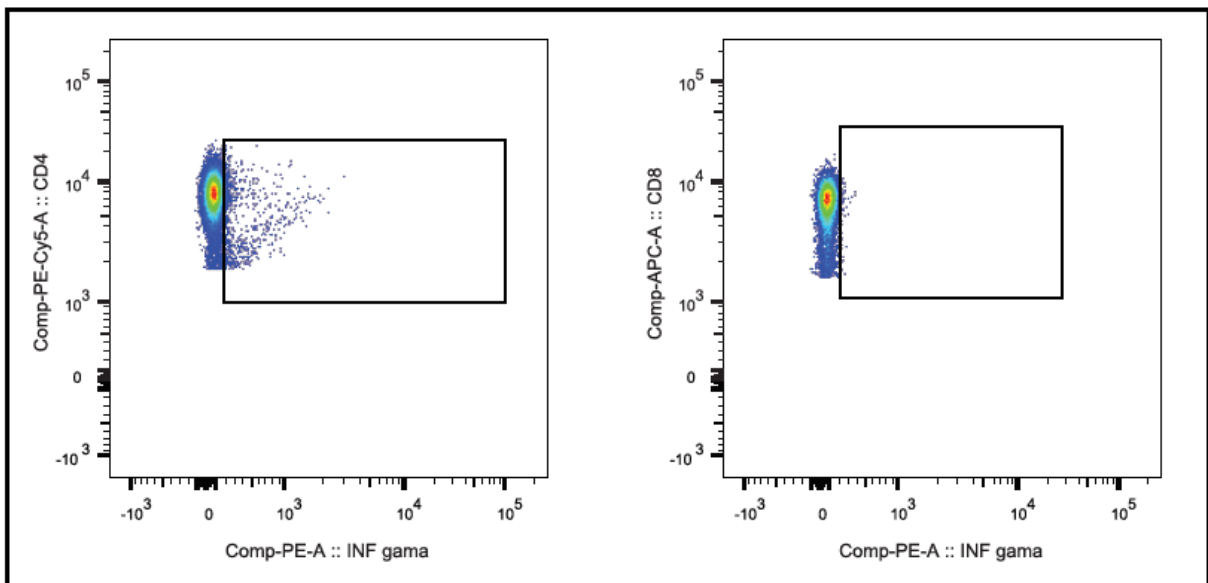


Figura 9 - Dot-plot das populações de CD4(A) e CD8(B) produtoras de IFN- γ .
 PECy-5: Ficoeritrina-Cianina 5; APC: Aloficocianina; PE: Ficoeritrina.

4.5. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada sob a orientação da Professora Dra. Edna Afonso Reis do Departamento de Estatística do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os dados obtidos nas leituras no Citometro de Fluxo foram análises a partir da obtenção do Índice de padronização, o qual foi calculado através da fórmula abaixo:

$$\text{Índice} = \frac{\text{células estimuladas com MPs marcadas com Anticorpos}}{\text{Células não estimuladas marcadas com Anticorpos}}$$

O índice foi calculado para cada amostra de pacientes. Posteriormente foi calculado a média do índice para grupo de pacientes: LESABA, LESAMA, ODA e CT e a partir das médias foram feitas as análises estatísticas.

As variáveis foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis através da comparação entre as medianas, para as análises que apresentaram diferença significativa foi realizado o teste de Wilcoxon (comparação 2 a 2) para identificar a diferença significativa. Para as análises da variável “idade” foi utilizado o teste One-way ANOVA por teste de Tukey. Além disso, foi realizado também o teste de correlação entre as variáveis pelo teste de Rô Spearman. Os Boxplots foram elaborados utilizando o software MiniTab (versão 18).

Para os valores significativos foi utilizado o valor de p de 0,10. O valor-p descreve a probabilidade de se observar os resultados da amostra sob a hipótese nula (de não efeito ou não diferença), portanto, o valor $p=0,10$ é um valor baixo, especialmente para amostras pequenas; o que permite descrever os resultados e indicar possíveis efeitos.

4.6. Delineamento Experimental

A **Figura 10** ilustra todas as etapas do projeto.

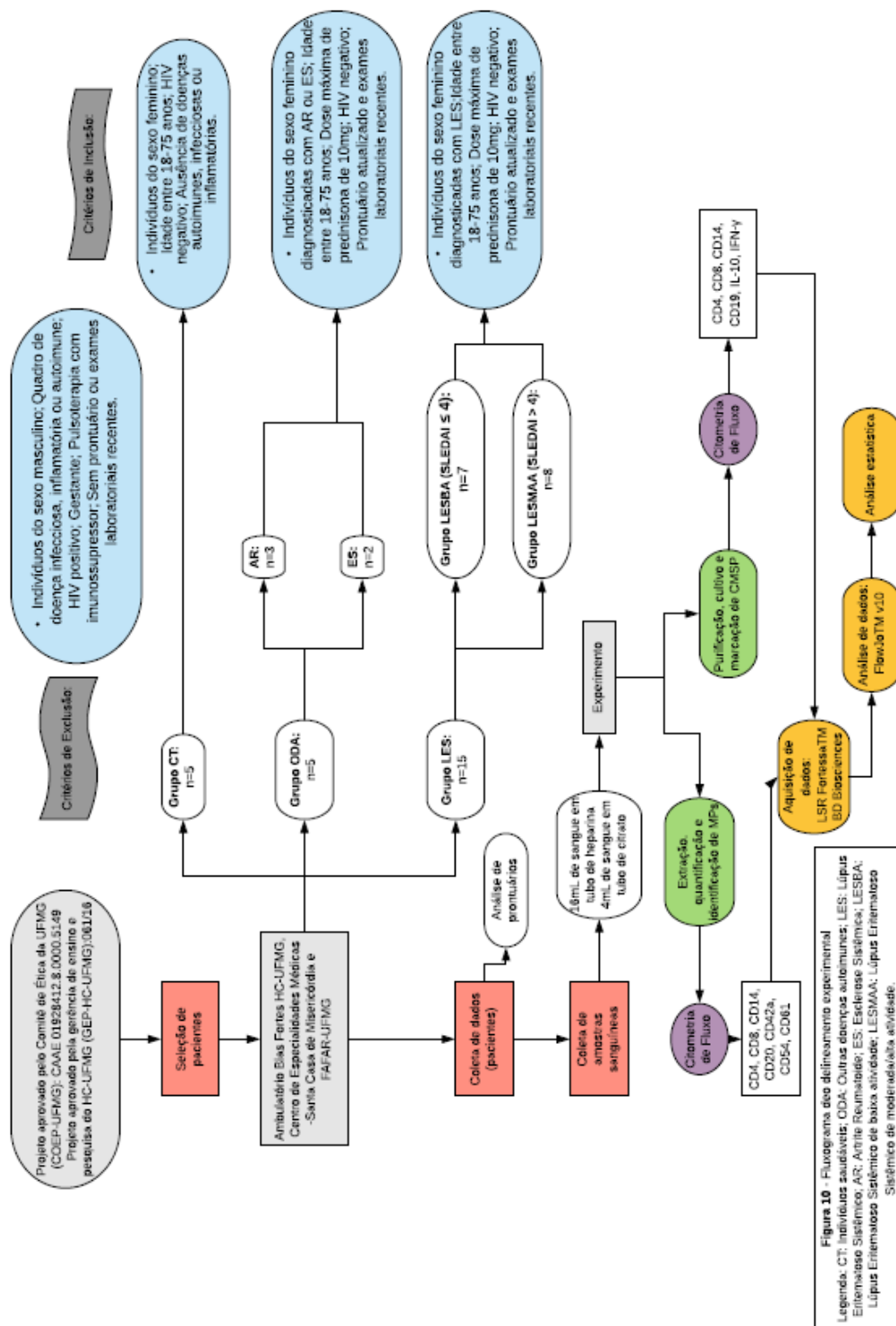


Figura 10 – Fluxograma do delineamento experimental

CT: Indivíduos saudáveis; ODA: Outras doenças autoimunes; LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico; AR: Artrite Reumatoide; ES: Esclerose Sistêmica; LESBA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de baixa atividade; LESMAA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de moderada/alta atividade.

5. RESULTADOS

O estudo incluiu 25 participantes que atenderam aos critérios de inclusão (item 4.2.1) e aos critérios de exclusão (item 4.2.2). As pacientes dos grupos LESABA, LESAMA e ODA foram recrutados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e no Centro de Especialidades Médicas da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte. Os indivíduos saudáveis foram recrutados na Faculdade de Farmácia da UFMG.

Foram 15 pacientes com LES, sendo 7 do grupo LESABA e 8 do grupo LESAMA. O total de pacientes com LES apresentaram uma média de idade e de tempo de doença de $42 \pm 12,08$ e $15,85 \pm 10,39$, respectivamente.

As participantes representantes do grupo LESABA apresentaram uma média de idades de $49,29 \pm 5,055$ (27-63) anos. Já as participantes do grupo LESAMA tiveram uma média de idade de $36 \pm 2,74$ (27-50) anos.

As pacientes do grupo ODA foram constituídas por 3 pacientes com Artrite Reumatoide e 2 pacientes com Esclerodermia Sistêmica. Essas pacientes apresentaram uma média de idades $58 \pm 5,45$ (46-74). E por fim, as 5 pacientes do grupo controle apresentaram uma média de idade de $44,8 \pm 3,455$ (36-57) anos.

Houve diferença significativa ($p < 0,10$) na média das idades entre os grupos LESAMAxODA (**Figura 11**).

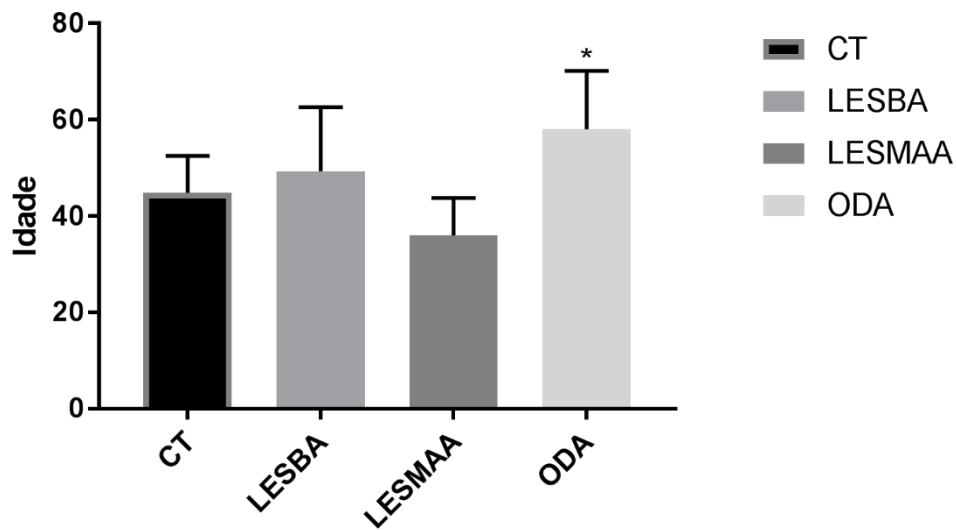


Figura 11 – Comparação das médias das idades entre os grupos.

CT: indivíduos saudáveis; LESABA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de baixa atividade; LESAMA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de moderada/alta atividade; ODA: Outras doenças autoimunes; * $p=0,0073$ (Teste Tukey).

Quanto ao tempo de doença o grupo LESABA apresentou uma mediana de 19 (5-39) anos, e além disso, o grupo apresentou também uma mediana de SLEDAI-2k de 0 (0-1). Já as participantes do grupo LESAMA apresentaram uma mediana de tempo de doença de 13 (1-30) anos e uma mediana de SLEDAI-2k de 7,5 (6-12). E por fim, o grupo ODA apresentou uma mediana de tempo de doença de 19 (9-34) anos.

A análise estatística dos dados Índice de SLEDAI-2k e tempo de doença estão representados na **Tabela 5**. Baseado na mediana, pode-se observar que não houve diferença significativa ($p<0,10$) no tempo de doença entre os diferentes grupos LESABA, LESAMA e ODA.

Tabela 5 - Dados demográficos dos participantes do estudo:

	Grupos				Valor p
	Mediana (mínimo-máximo)				
	LESABA (n=7)	LESAMA (n=8)	ODA (n=5)	CT (n=5)	
SLEDAI-2k	0 (0-1)	7,5 (6-12)	-	-	
Tempo de doença (anos)	19 (5-39)	13 (1-30)	19 (9-34)	-	0,531

LESABA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de baixa atividade; LESAMA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de moderada/alta atividade; ODA: outras doenças autoimunes; CT: controle; *- p<0,10= diferença significativa (teste de Kruskal-Wallis).

A **Tabela 6** mostra os critérios ACR apresentados pelas pacientes durante o momento do diagnóstico.

Tabela 6 - Critérios ACR apresentados pelas pacientes com LES no momento do diagnóstico.

Manifestações	LES (n=15)	LESABA (n=7)	LESAMA (n=8)
Erupção malar	7 (46,7%)	4 (57,1%)	3 (37,5%)
Erupção discoide	-	-	-
Fotossensibilidade	11 (73,3%)	6 (85,7%)	5 (62,5%)
Úlceras orais	7 (46,7%)	3 (42,8%)	4 (50,0%)
Artrite	7 (46,7%)	6 (85,7%)	1 (12,5%)
Serosite	5 (33,3%)	4 (57,1%)	1 (12,5%)
Distúrbio renal	7 (46,7%)	2 (28,6%)	5 (62,5%)
Distúrbio neurológico	2 (13,3%)	1 (14,3%)	1 (12,5%)
Distúrbios hematológicos			
• Anemia	1 (6,7%)	-	1 (12,5%)
• Leucopenia	5 (33,3%)	3 (42,8%)	2 (25,0%)
• Linfopenia	6 (40,0%)	5 (71,4%)	1 (12,5%)
• Plaquetopenia	1 (6,7%)	1 (14,3%)	-
Distúrbios imunológicos			
• Anti-Sm	2 (13,3%)	1 (14,3%)	1 (12,5%)
• Anti-dsDNA	5 (33,3%)	3 (42,8%)	2 (25,0%)
FAN-Hep2	15 (100%)	7 (100%)	8 (100%)

ACR: American College of Rheumatology; LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico; LESABA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de baixa atividade; LESAMA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de moderada/alta atividade; Anti-Sm: Anticorpo Smith; FAN-Hep2: Fator antinuclear em células Hep2.

As manifestações mais frequentes apresentadas pelas pacientes com LES durante o diagnóstico foram presença de anticorpos antinucleares (FAN-Hep2+) e

fotosensibilidade, 100 e 73,3%, respectivamente. Sendo que as pacientes do grupos LESABA apresentaram um predomínio de artrite (85,7%) e linfopenia (71,4%), já as pacientes do grupo LESAMA apresentaram distúrbios renais (62,5%). Além disso, 2 pacientes apresentaram alopecia, sendo 1 do grupos LESABA e 1 do grupo LESAMA.

A atividade da doença foi avaliada pela equipe médica de acordo com o Índice SLEDAI-2k (**Anexo 3**). A **Tabela 7** mostra os principais critérios pontuados pelas pacientes de acordo com a divisão dos grupo LESABA (SLEDAI-2k \leq 4) e LESAMA (SLEDAI-2k $>$ 4).

Tabela 7 - Critérios SLEDAI-2k pontuados pelas pacientes com LES.

Critérios SLEDAI-2k	LES (n=15)	LESABA (n=7)	LESAMA (n=8)
Hematúria	3 (20%)	-	3 (37,5%)
Proteinúria	4 (26,67%)	-	4 (50%)
Piúria	1 (6,67%)	-	1 (12,5%)
Rash cutâneo	1 (6,67%)	-	1 (12,5%)
Alopecia	2 (13,33%)	-	2 (25%)
Úlcera mucosa	2 (13,33%)	-	2 (25%)
Complemento baixo	6 (40%)	-	6 (75%)
Anticorpo Anti-dsDNA	4 (26,67%)	-	4 (50%)
Febre	1 (6,67%)	-	1 (12,5%)
Leucopenia	1 (6,67%)	1 (14,29%)	

LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico; LESABA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de baixa atividade; LESAMA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de moderada/alta atividade.

Nota-se que as pacientes com LES apresentaram apenas 10 dos 24 critérios constantes do Índice SLEDAI-2k (**Anexo 3**), foram pontuados índices laboratoriais e índices clínicos.

5.1. Resultados Laboratoriais

Os dados laboratoriais das pacientes recrutadas foram obtidos de seus prontuários no momento da coleta das amostras biológicas.

A **Tabela 8** apresenta a análise dos resultados dos hemogramas das pacientes.

Tabela 8 - Resultados do hemograma das pacientes com LES e ODA coletados dos prontuários médicos no momento da coleta.

	Grupos			Comparação entre grupos	Valor p
	Mediana (mínimo- máximo)				
	LESABA	LESAMA	ODA		
Global de Leucócitos (x10 ³ /mm ³)	5,0 (2,76-6,24)	5,9 (4,21-10,8)	6,13 (3,45-7,35)		0,364
Linfócitos (x10 ³ /mm ³)	1,07 (0,80-3,0)	0,920 (0,640-3,59)	2,567 (1,427-3,26)		0,104
Neutrófilos (x10 ³ /mm ³)	2,220 (1,390-4,370)	3,940 (2,670-7,614)	2,574 (1,557-4,189)	LESABA x LESAMA LESABA x ODA LESAMA x ODA	0,074* 0,053* 1 0,073*
Hemoglobina (g/dL)	13,7 (12,5-14,2)	12,95 (10,2-15,6)	13,1 (12,5-15,3)		0,584
Hematócrito (%)	39,5 (37,2-41)	39,1 (32-46,5)	40,1 (37-43,3)		0,955
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	225 (146-340)	222 (147-366)	230 (127-248)		0,795

LESABA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de baixa atividade; LESAMA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de moderada/alta atividade; ODA: Outras doenças autoimunes; * - p<0,10= diferença significativa (teste de Kruskal-Wallis).

De acordo com a **Tabela 8**, pode-se observar uma diferença significativa nos valores de neutrófilos (p<0,10) através da comparação das medianas dos grupos. O valor p dos neutrófilos (teste de Kruskal-Wallis) inferior a 0,10 foi utilizado devido ao N amostral ser pequeno e as análises laboratoriais sofrerem variações entre indivíduos. Com a comparação 2 a 2 (teste de Wilcoxon) para as medianas de neutrófilos evidenciou-se uma diferença significativa entre os grupos LESABA e LESAMA e os grupos LESAMA e ODA que apresentaram um valor p de 0,053 e 0,073, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de Hemoglobina, Hematócrito e Plaquetas.

A **Tabela 9** mostra os demais resultados laboratoriais presentes nos prontuários das pacientes no momento da coleta das amostras biológicas.

Tabela 9 - Exames laboratoriais das pacientes com LES e ODA coletados dos prontuários médicos no momento da coleta.

	Grupos			Comparação entre grupos	Valor p
	Mediana (mínimo- máximo)				
	LESABA	LESAMA	ODA		
C3 (mg/dL)	114 (76-138)	75 (50-174)	-		0,156
C4 (mg/dL)	33,5 (17-50)	11,5 (4-38)	-	LESABA x LESAMA	0,045* 0,053*
PCR (mg/dL)	6,9 (4,9-7,42)	5,87 (1,19-12,6)	4,9 (4,1-13,75)		0,918
AST (U/L)	25,5 (17-89)	21 (14-55)	25 (21-28)		0,846
ALT (U/L)	27,5 (23-137)	27 (5-143)	14 (10-34)		0,249
Ureia sérica (mg/dL)	30,5 (20-42)	33,5 (27-47)	32 (23-47)		0,725
Creatinina sérica (mg/dL)	0,74 (0,61-1,53)	0,6 (0,44-1,39)	0,84 (0,73-0,97)		0,279

LESABA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de baixa atividade; LESAMA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de moderada/alta atividade; ODA: Outras doenças autoimunes; C3: fração do sistema de complemento; C4: fração do sistema de complemento; PCR: Proteína C reativa; AST: transaminase glutâmico-oxalacética; ALT: transaminase glutâmico-pirúvica; * - $p < 0,10$ = diferença significativa (teste de Kruskal-Wallis).

De acordo com a **Tabela 9** foi observado uma diferença significativa nos valores de C4 ($p < 0,10$) através da comparação das medianas dos grupos. O valor p de C4 (teste de Kruskal-Wallis) inferior a 0,10 foi utilizado devido ao N amostral ser pequeno e as análises laboratoriais sofrerem variações entre indivíduos. Com a comparação 2 a 2 (teste de Wilcoxon) para as medianas de C4 evidenciou-se uma diferença significativa entre os grupos LESABA e LESAMA valor $p = 0,053$. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de C3, PCR, AST, ALT, Ureia sérica e Creatinina sérica.

O grupo LESAMA apresentou medianas de C3 e C4 inferiores as medianas do grupo LESABA, resultado esse que condiz com uma maior atividade no primeiro grupo. O LESAMA apresentou também maiores níveis de ureia, o que pode sugerir um dano renal.

5.2. Caracterização de Micropartículas

As MPs autólogas das pacientes foram quantificadas e caracterizadas através da leitura em Citometro de Fluxo. A **Tabela 10** nos mostra que houve diferença significativa ($p < 0,10$) apenas nas MPs originadas de CD4 e CD14 (valor de p de 0,008 e 0,027, respectivamente), sendo que as MPs originadas de CD4 apresentaram diferença estatística entre os grupos LESABAxCT ($p=0,003$), LESAMAxCT ($p=0,019$) e ODAxCT ($p=0,016$), o que sugere um aumento de MPs CD4+ em doenças autoimunes. Entre as MPs de origem de CD14, a diferença significativa também ocorreu entre os grupos LESABAxCT ($p=0,005$), LESAMAxCT ($p=0,065$) e ODAxCT ($p=0,016$), o que também evidencia um aumento de MPs CD14+ em pacientes com doenças autoimunes.

Tabela 10 – Comparação das medianas da quantificação e caracterização das MPs.

GRUPOS					Comparação entre grupos	Valor p
	Mediana (mínimo-máximo)					
	LESABA (n=7)	LESAMA (n=8)	ODA (n=5)	CT (n=5)		
Nº	384	759	373	466		0,302
MPs/ μ L	(177-971)	(466-1309)	(200-1223)	(50-6911)		
CD4 (%)	5,80 (5,07-8,88)	4,94 (3,88-14,40)	9,67 (4,12-11,50)	3,18 (2,30-4,38)	LESABA x LESAMA	0,008*
					LESABA x ODA	0,152
					LESABA x CT	0,530
					LESAMA x ODA	0,003*
					LESAMA x CT	0,187
					ODA x CT	0,019*
CD8 (%)	4,00 (0,45-7,31)	4,08 (2,90-15,40)	3,78 (2,92-5,79)	3,98 (2,32-5,00)		0,016*
CD14 (%)	70,70 (67,70- 78,30)	72,05 (54,30-79,10)	75,40 (68,00- 85,30)	56,30 (55,00-69,10)	LESABA x LESAMA	0,925
					LESABA x ODA	0,027*
					LESABA x CT	0,867
					LESAMA x ODA	0,268
					LESAMA x CT	0,005*
					ODA x CT	0,284
CD20 (%)	14,50 (8,88-17,90)	7,72 (4,09-66,30)	8,69 (4,84-26,60)	10,40 (4,82-25,00)		0,065*
CD42 (%)	49,80 (9,72-57,60)	36,25 (14,60-67,10)	24,60 (10,10- 76,70)	23,20 (20,40-26,80)		0,016*
CD54 (%)	9,15 (3,91-9,59)	5,36 (2,82-22,30)	4,23 (2,64-12,50)	3,40 (1,92-6,12)		0,855
CD61 (%)	43,10 (12,90- 62,10)	40,60 (10,60-59,30)	17,50 (8,40-78,90)	21,10 (20,50-27,00)		0,532

MPs: Micropartículas; LESABA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de baixa atividade; LESAMA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de moderada/alta atividade; ODA: Outras doenças autoimunes; CT: indivíduos saudáveis; *- $p < 0,10$ = diferença significativa (teste de Kruskal-Wallis).

5.3. Análise de Células Mononucleares de Sangue Periférico

As CMSP foram estimuladas com as MPs autólogas e analisadas em Citometro de Fluxo, para a avaliação desse estímulo. De acordo com a **Figura 12** pode-se observar que não houve diferença significativa ($p < 0,10$) entre as medianas das CMSP CD4+ e CD8+. Além disso, ainda de acordo com a **Figura 12**, também não houve

diferença significativa ($p < 0,10$) na produção de IL-10 pelas células CD4 e CD8 entre os grupos de pacientes analisados.

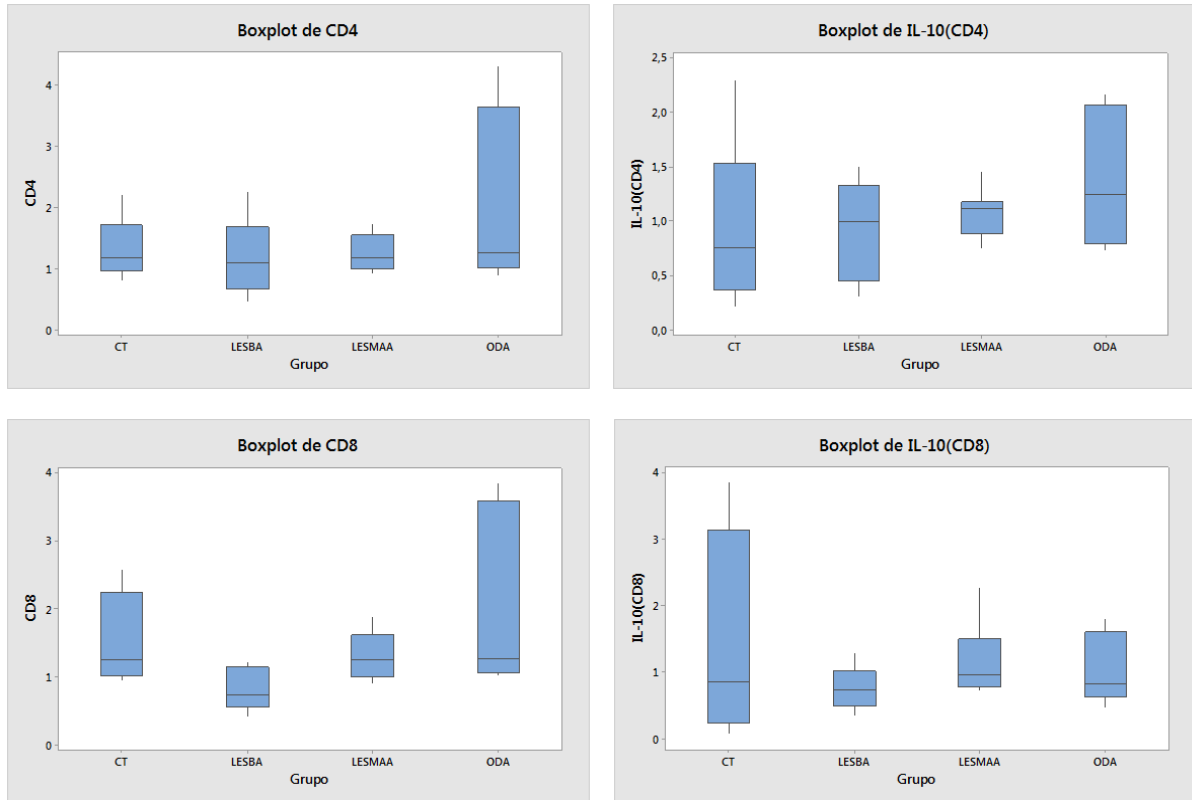


Figura 12 – Boxplots de CMSP CD4+ e CD8+ produzindo IL-10.

CT: controle; LESABA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de baixa atividade; LESAMA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de moderada/alta atividade; ODA: outras doenças autoimunes.

A **Figura 13** mostra que houve diferença significativa ($p < 0,10$) apenas na produção de IFN- γ pelas células CD8+ (valor de $p = 0,058$). A diferença significativa ocorreu entre os grupos LESAMAxODA e ODAxCT (valores de p de 0,045 e 0,032, respectivamente), o que sugere um aumento na produção de IFN- γ em pacientes com outras doenças autoimunes.

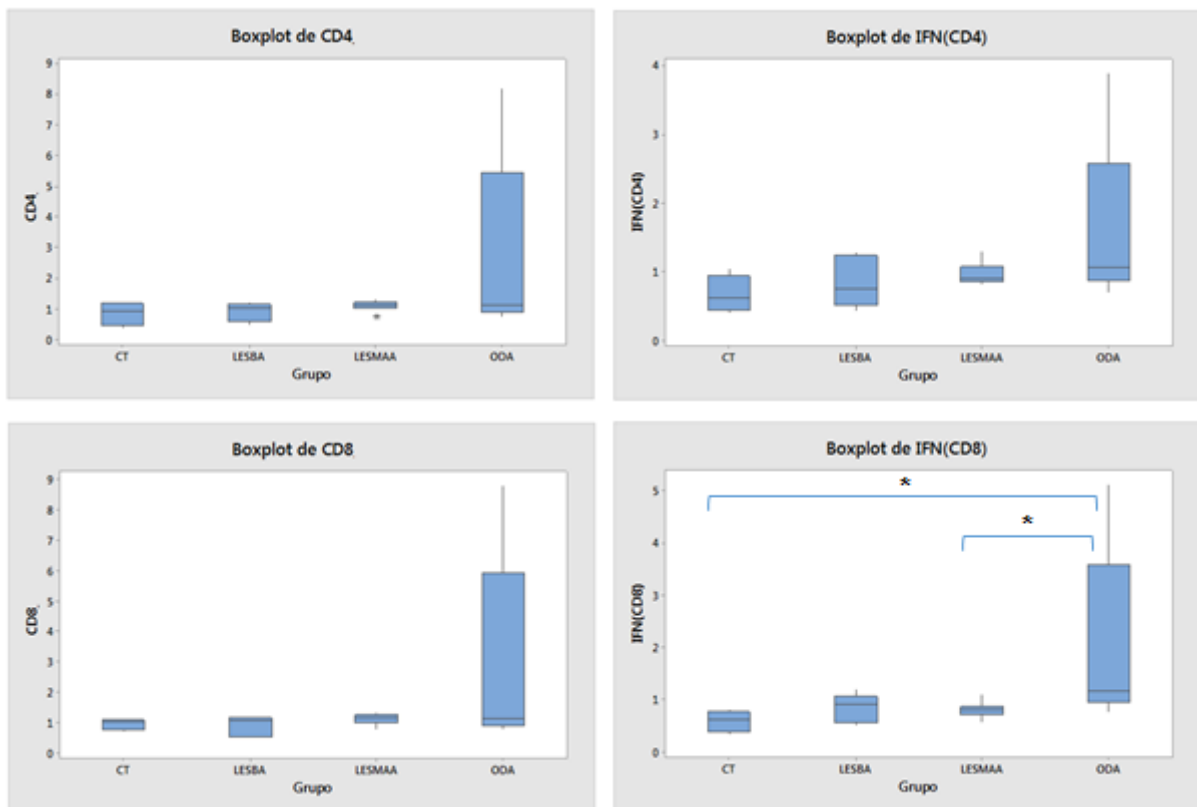


Figura 13– Boxplots de CMSP CD4+ e CD8+ produzindo IFN- γ .

CT: controle; LESBA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de baixa atividade; LESMAA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de moderada/alta atividade; ODA: outras doenças autoimunes. * $p < 0,10$ = diferença significativa (teste de Kruskal-Wallis).

Ainda de acordo com a **Figura 13**, não houve diferença significativa ($p < 0,10$) entre as medianas das CMSP CD4+ e CD8+. Além disso, também não houve diferença significativa ($p < 0,10$) na produção de IFN- γ pelas células CD4 entre os grupos de pacientes analisados.

E por fim, a **Figura 14** mostra os Boxplots de CMSP CD14+ e CD19+. Observando a figura percebe-se que não houve diferença significativa ($p < 0,10$) entre as medianas dos diferentes grupos analisados.

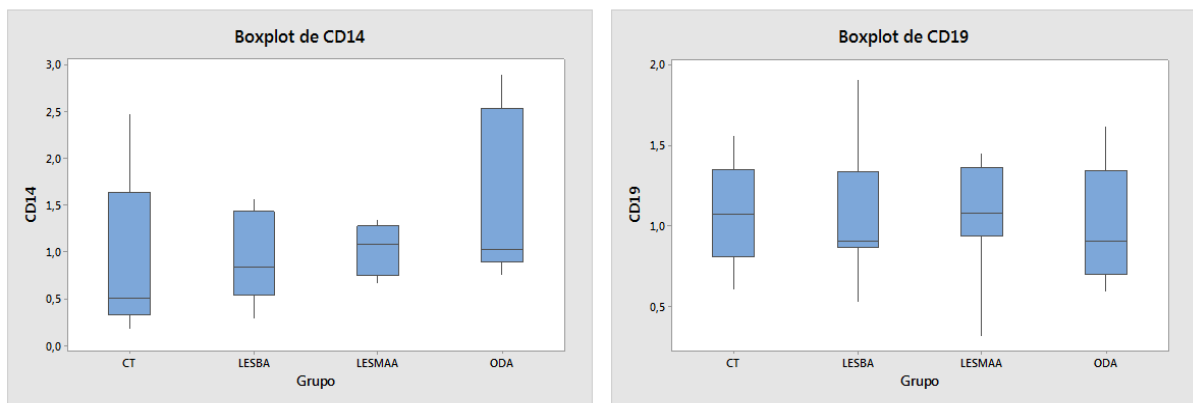


Figura 14 – Boxplots de CMSP CD14+ e CD19+.

CT: controle; LESABA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de baixa atividade; LESAMA: Lúpus Eritematoso Sistêmico de moderada/alta atividade; ODA: outras doenças autoimunes.

5.4. Correlações entre os exames laboratoriais e os SLEDAI-2k das pacientes

A **Figura 15** apresenta a correlação do SLEDAI-2k com a idade das pacientes com LES e com o tempo de diagnóstico. Nas duas comparações a correlação foi negativa (-0,610 e -0,272, respectivamente), porém apenas o critério idade apresentou diferença significativa (valor $p=0,016$), sugerindo que pacientes mais novas tendem a apresentar índice de SLEDAI-2k mais elevados.

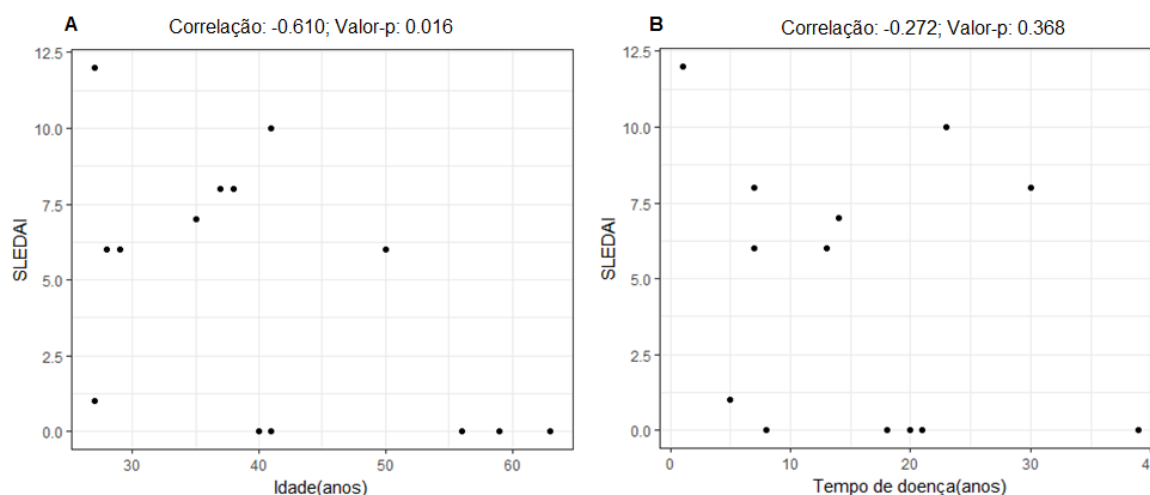


Figura 15 – Gráfico de correlação entre as idades e tempo de diagnóstico das pacientes com LES com o índice SLEDAI-2k.

(A) Idade, em anos, das pacientes; (B) tempo de diagnóstico, em anos, das pacientes. Dados analisados pelo teste de Correlação de Rô Spearman (valores significativos $p < 0,10$).

A **Figura 16** apresenta a correlação do SLEDAI-2k com o resultado do hemograma das pacientes com LES. Nas análises de Leucócitos e Neutrófilos a correlação foi positiva, sugerindo que quanto maior os valores de dosagem de leucócitos e neutrófilos maior será o índice SLEDAI-2k. Isso pode ser explicado através do fato de pacientes com atividade lúpica poderem apresentar quadros de leucocitose decorrentes de uma neutrofilia por presença de quadros infecciosos. Já nas análises de Linfócitos, Hemoglobina, Hematócrito e Plaquetas a correlação foi negativa, sugerindo que quanto menor os valores dessas dosagens maior será o índice SLEDAI-2k, isso pode ser decorrente do fato de pacientes com atividade lúpica poderem apresentar quadros de linfopenia, anemia e plaquetopenia. Ainda de acordo com a Figura 17, observa-se que apenas os neutrófilos apresentaram diferença significativa ($p=0,053$).

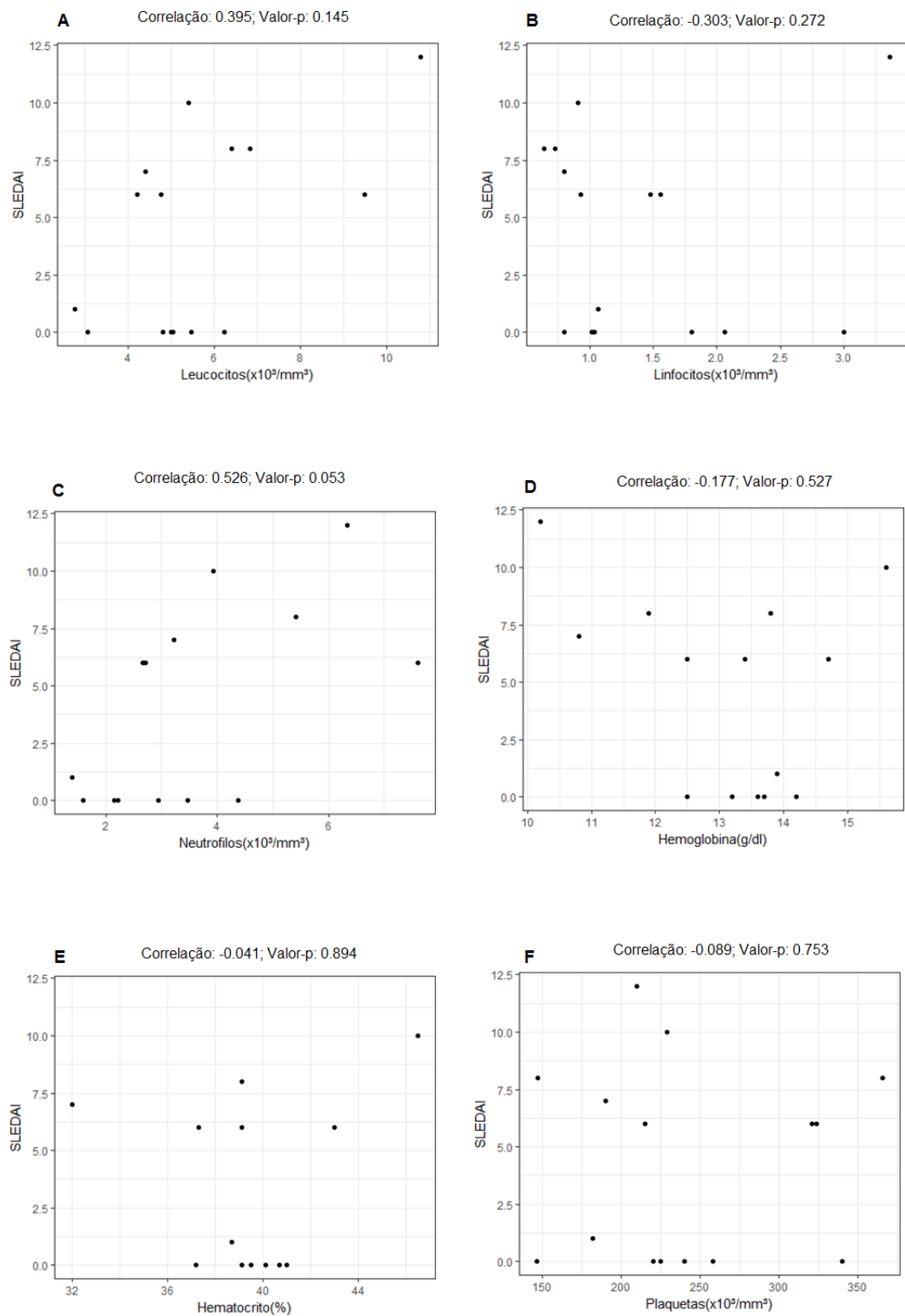


Figura 16 - Gráfico de correlação entre as análises do hemograma das pacientes com LES e o índice SLEDAI-2k.

(A) Leucócitos; (B) Linfócitos; (C) Neutrófilos; (D) Hemoglobina; (E) Hematócrito; (F) Plaquetas. Dados analisados pelo teste de Correlação de Rô Spearman (valores significativos $p < 0,10$).

A **Figura 17** apresenta a correlação do SLEDAI-2k com o resultado dos exames C3, C4, PCR, AST, ALT, Ureia, Creatinina das pacientes com LES. As dosagens de C3, C4, TGO, TGP e Creatinina apresentaram correlação com o índice SLEDAI-2k negativa, o que sugere que quanto menor os valores desses marcadores maior será o índice SLEDAI-2k. As correlações negativas de C3 e C4 corroboram com o fato de que pacientes em atividade tendem a apresentar quadros de hipocomplementemia. Os marcadores PCR e Ureia apresentaram correlação positiva, sugerindo que quanto maior os seus valores maior será o índice SLEDAI-2k. Apenas os índices C3 e C4 apresentaram diferença significativa ($p < 0,10$) com um valor de p de 0,080 e 0,005, respectivamente.

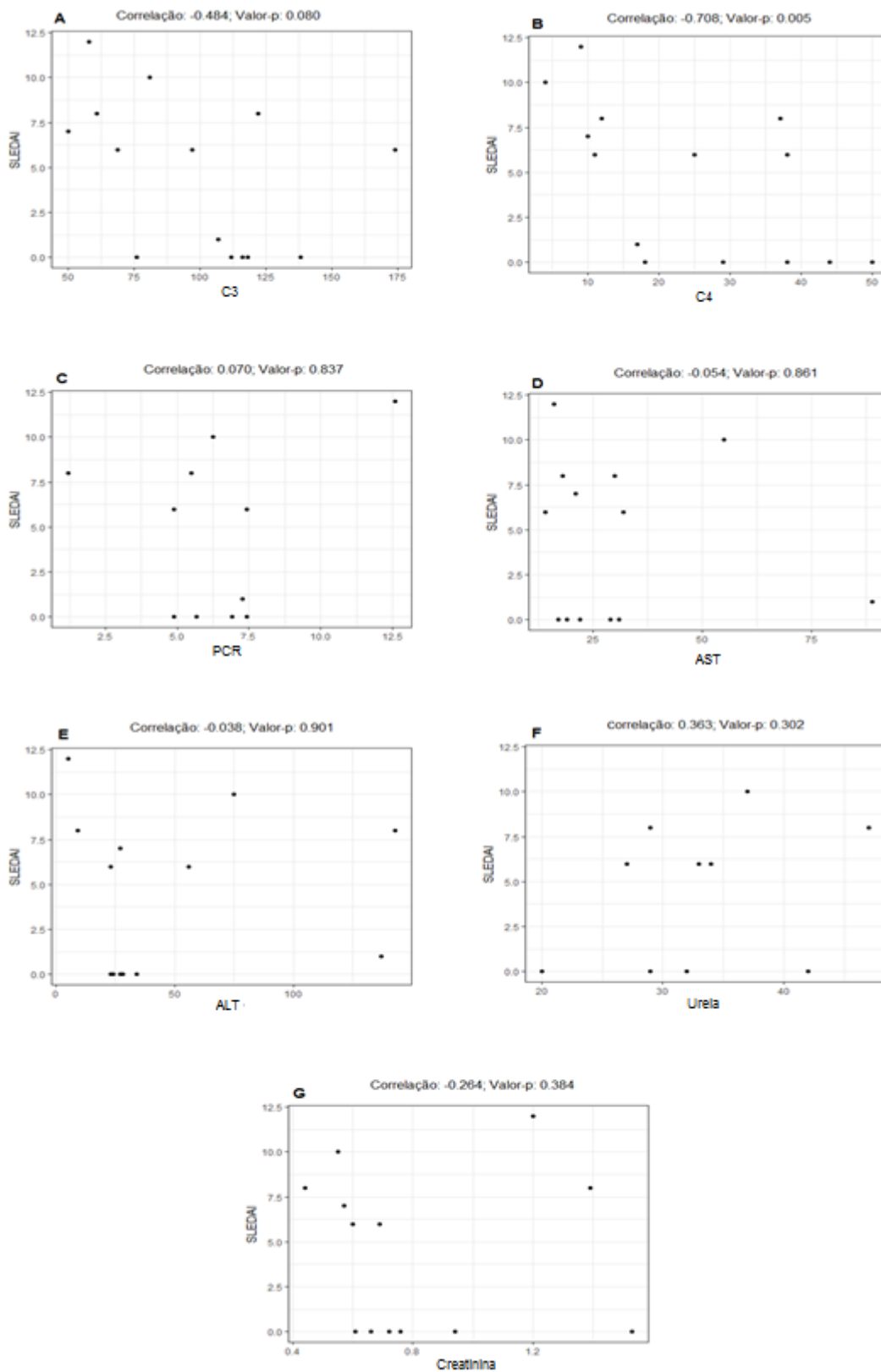


Figura 17 - Gráfico de correlação entre as análises C3, C4, PCR, AST, ALT, Ureia, Creatinina das pacientes com LES e o índice SLEDAI-2k.

(A) C3; (B) C4; (C) PCR; (D) AST; (E) ALT; (F) Ureia; (G) Creatinina. Dados analisados pelo teste de Correlação de Rô Spearman (valores significativos $p < 0,10$).

6. DISCUSSÃO

O LES é uma doença bastante complexa pelo fato de autoantígenos do hospedeiro e componentes do sistema imune celular e humoral estarem envolvidos, os quais causam lesões teciduais em vários órgãos ou tecidos (MIYAKE et al, 2011; GOTTSCHALK et al, 2015). Além disso, o LES apresenta um quadro clínico e laboratorial variando com sinais e sintomas que comprometem o diagnóstico e o tratamento (MATHIAN et al, 2015). O diagnóstico do LES ainda não está muito bem definido, baseando-se em critérios clínicos e achados laboratoriais, porque ainda hoje não se tem um exame único que o diagnostique e nem os sinais e sintomas são específicos e característicos de um quadro de LES. Na sua patogênese, a interação de fatores genéticos e ambientais levam a disfunção imune celular, incluindo produção de IFN do tipo 1 e excessiva produção de anticorpos, principalmente anti-nucleares, sendo o anti-DNA o mais característico. (TSOKOS et al, 2011). No entanto, apesar da melhor compreensão da patogênese, a morbidade e a mortalidade associadas ao LES ainda representam grandes desafios para pacientes que enfrentam esta doença e os médicos que os tratam (JUNE e AGGARWAL, 2014; VASQUEZ-CANIZARES et al, 2017).

Para se compreender melhor a patogênese do LES, é necessário conhecer a origem e as propriedades das moléculas nucleares que geram a produção de anticorpos antinucleares, pois é através dessa interação que ocorre a formação de imunocomplexos que se depositarão nos tecidos. Recentes estudos mostram o papel de MPs como autoantígenos e adjuvantes, os quais podem apresentar um papel significativo na doença (PISETSKY e LIPSKY, 2010).

Robson e Walport (2001) avaliaram as MPs como material autoantigênico e a deficiência de componentes da Via clássica do Sistema de complemento (C1q e C4) no surgimento da doença. A deficiência de C1q e C4 predispõe o LES nos indivíduos, porém a deficiência do gene C1q em camundongos está associada ao desenvolvimento de LES-like com comprometimento renal. Munhoz et al, (2010), sugeriram que estes componentes são relevantes no clearance de debris celulares, inclusive MPs, e quando esse processo não ocorre pode haver um favorecimento para

a patologia da doença. Corpos apoptóticos bem como vesículas (precursoras de MPs) poderiam se ligar ao C1q ativando o Sistema de complemento e o processo de clearance imunológico (NAUTA et al, 2012).

Atualmente, observa-se um aumento no número de pessoas acometidas pelo LES, o que torna necessário a padronização de novos métodos de diagnóstico que sejam mais sensíveis e específicos (AHEARN et al, 2012; JUNE e AGGARWAL, 2014). A partir disso, o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos que facilitem a detecção precoce da doença é de extrema importância, não só pelo fato de agilizar o tratamento e prevenir danos aos órgãos, mas também pelo fato do impacto econômico positivo do diagnóstico precoce. Testes sorológicos convencionais atualmente utilizados para diagnóstico e monitoramento da doença no LES, como anticorpos anti-nucleares, anticorpos anti-dsDNA e níveis de complemento, não apresentam boa sensibilidade ou especificidade, sendo necessário a associação a critérios clínicos e outros exames complementares. Um mais específico e útil teste para determinar o prognóstico em pacientes com envolvimento renal é a biópsia renal, porém trata-se de um procedimento invasivo que acarreta riscos adicionais (MIYAKE et al 2011; COSTA e COIMBRA, 2014).

A partir deste contexto, avaliou-se o perfil de MPs nas pacientes com LES, visando diferenciar um quadro de doença com baixa atividade de doença com moderada/alta atividade. Além disso, avaliou-se também, o perfil de estímulo das MPs nas populações celulares dessas pacientes.

Visto que o LES ocorre mais comumente na população feminina, o estudo foi conduzido com 15 mulheres, sendo 7 classificadas com LES de baixa atividade e 8 com LES de moderada/alta atividade. Além disso, o controle do estudo foi realizado com o recrutado de 5 mulheres para o grupo ODA e 5 mulheres para o grupo CT. O grupo ODA foi introduzido com o objetivo de avaliar se as possíveis alterações encontradas nas pacientes com LES, eram realmente uma característica do LES ou uma característica geral de pacientes com doenças autoimunes.

A média de idade das pacientes com LES foi de $42 \pm 12,08$ anos, variando de 27-63 anos, e a média do tempo de diagnóstico da doença foi $15,85 \pm 10,39$ anos. Em um estudo realizado por Nakashima et al (2011) observou-se que a média de idade

foi de $41,5 \pm 14,44$ anos, variando de 22-69 anos, o que foi semelhante ao encontrado em nosso estudo.

A média de idade das pacientes do grupo LESABA foi de $49,29 \pm 5,055$ anos com variação de 27-63 anos, já a do grupo LESAMA foi $36 \pm 2,738$ com variação de 27-50 anos. Um estudo realizado por Cicarini et al (2018) mostrou uma média de idade de $44 \pm 14,65$, variando de 24–61 anos nas pacientes classificados com SLEDAI-2k ≤ 4 e $40 \pm 12,73$, variando de 18–61 anos para pacientes com SLEDAI-2k >4 .

As pacientes dos grupos ODA e CT apresentaram uma média de idade de $58 \pm 5,45$ e $44,80 \pm 3,455$ anos, respectivamente. Higgs et al (2011) encontraram valores de média das idades de $43,00 \pm 1,9$, $39,80 \pm 9,40$ e $52,80 \pm 13,20$ para indivíduos com LES, CT e ODA, respectivamente.

De acordo com a análise estatística houve diferença significativa na média das idades ($p=0,0073$) entre os grupos LESAMAxODA, o que pode ser explicado pelo fato de pacientes com LES em moderada/alta atividade, em geral, apresentarem idades menores quando comparadas com pacientes com AR. Os grupos LESABAxODA não apresentaram diferença significativa.

Quanto ao tempo de diagnóstico as pacientes do grupo LESABA apresentaram uma mediana de 19 (5-39) anos, as do grupo LESAMA uma mediana de tempo de doença de 13 (1-30) anos e por fim, as do grupo ODA uma mediana de 19 (9-34). Não houve diferença significativa entre os grupos analisados ($p=531$).

O recrutamento das pacientes foi feito baseado na pontuação do índice SLEDAI-2k e na avaliação clínica e dos prontuários das pacientes. A mediana do índice SLEDAI-2k foi de 0 (0-1) para os grupos LESABA (SLEDAI-2k ≤ 4) e 7,5 (6-12) LESAMA (SLEDAI-2k >4), respectivamente. Os critérios mais pontuados foram hematúria, proteinúria, piúria, rash cutâneo, alopecia, úlcera mucosa, redução de complemento, Anti-dsDNA+, febre e leucopenia nas pacientes do grupo LESAMA o que condiz com uma elevação do índice SLEDAI-2k. Já no grupo LESABA apenas uma paciente pontuou no índice SLEDAI-2k, uma leucopenia. Em geral, pacientes com baixa atividade tendem a não ter sintomas ou são menos graves, que pontuam menos no SLEDAI-2k, ou apresentam um maior controle da doença.

O LES apesar de apresentar quadros de remissão, não tem cura, isso é decorrente do fato da doença não ser totalmente conhecida e esclarecida e conseqüentemente as terapias disponíveis não serem curativas. Os pacientes hoje são comumente diagnosticados de acordo com critérios de classificação do ACR ou com o Sistema SLICC (KUHNS et al, 2015, VASQUEZ-CANIZARES et al, 2017).

As manifestações mais frequentes apresentadas pelas pacientes, deste estudo, durante o diagnóstico, de acordo com os critérios ACR/SLICC, foram a presença de fator antinuclear (FAN-Hep2+) e fotossensibilidade, em 100% e 73,3% das pacientes, respectivamente. Sendo que as pacientes do grupo LESABA apresentaram um predomínio de artrite (85,7%) e linfopenia (71,4%), já as pacientes do grupo LESAMA apresentaram distúrbio renais (62,5%). Além disso, 2 pacientes apresentaram alopecia, sendo 1 do grupo LESABA e 1 do grupo LESAMA. O achado menos recorrente nas pacientes foi distúrbios neurológicos ocorrendo em apenas 2 das 15 pacientes estudadas. Pacheco et al (2017), em um estudo realizado na Colômbia, evidenciaram 87% de FAN-Hep2+ e 72% de achados hematológicos, contra 18% de alterações neurológicas e 10% de alterações cutâneas.

Quanto aos resultados laboratoriais das pacientes foi observado no hemograma uma diferença significativa nos valores de neutrófilos ($p < 0,10$), sendo a diferença entre os grupos LESABAxLESAMA e os grupos LESAMAxODA (valor p de 0,053 e 0,073, respectivamente).

Neutrófilos tem sido associados a patogenia do LES, porém o seu aumento pode ser decorrente do uso de glicocorticoides (BOSCH, 2011; WEIDENBUSCH et al, 2017). No nosso estudo é importante ressaltar que apenas 1 paciente fez uso de glicocorticoide na concentração de 20mg, todas as demais pacientes que fizeram uso de glicocorticoides a dosagem foi inferior a 10mg.

MPs de neutrófilos tem sido associadas a desregulação imunológica do LES, potencializando a produção de IFN- α (WANG et al, 2015; MOREL, 2017). Em doenças reumáticas, anticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilos podem induzir a liberação de MPs a partir de neutrófilos tratados com citocinas. Essas MPs contêm enzimas neutrofilicas, como mieloperoxidase (MPO) e proteinase-3 (PR3) que são importantes antígenos-alvo (HONG et al, 2012).

Estudos recentes, como os de Garcia-Romo et al (2011) e Lande et al (2011) e, têm sugerido a importância dos neutrófilos na patogênese do LES e sobre como os eventos bioquímicos e celulares envolvidos estão relacionados. O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, estão associados ao LES, através de oxidação de proteínas e lipoproteínas e peroxidação lipídica (BOSCH, 2011; HONG et al, 2012). Esses achados sugerem que, no LES, autoanticorpos ativam os neutrófilos, que por sua vez liberam NETs contendo complexos de DNA. Estes complexos ativam as células dendríticas plasmocitoides, levando ao aumento de IFN- α e em consequência um processo inflamatório (WANG et al, 2015).

No nosso estudo, os neutrófilos apresentaram uma correlação positiva com o Índice SLEDAI-2k (correlação: 0,526) com um valor de p significativo de 0,053. O que sugere que quanto maior o valor de neutrófilos, maior o valor de SLEDAI-2k. Porém, nenhuma das pacientes participantes desse estudo apresentaram neutrofilia ou leucocitose.

Já em relação aos exames sorológicos foi observada uma diferença significativa nos valores de C4 ($p < 0,10$) através da comparação das medianas dos grupos LESABxLESAMA valor $p = 0,053$. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de C3, PCR, AST, ALT, Ureia sérica e Creatinina sérica.

Li et al (2015) evidenciaram que a redução de C3 ou C4 foi semelhante entre os pacientes com LES e aqueles com outras doenças, enquanto a prevalência de baixos níveis de C3 e C4 foi maior nos pacientes com LES (73,42%). Eles observaram também que a inclusão de hipocomplementemia como critério de classificação para o LES resultou em um aumento de 16,18% no número de pacientes diagnosticados para o grupo com LES, com uma correlação positiva com FAN+. Esses resultados sugerem que a hipocomplementemia tem importante valor diagnóstico para o LES ao melhorar a sensibilidade do diagnóstico de LES. C3 e C4 devem ser testados simultaneamente porque um nível baixo de C3 ou C4 por si só não é um critério imunológico adequado (LI et al, 2015).

Redução de C3 e C4, Anti-C1q+ e anti-dsDNA+ correlacionaram-se bem com a atividade global do LES ($r = -0,372-0,444$; $0,323-0,351$ e $0,353-0,566$,

respectivamente; $p < 0,001$), segundo estudo realizado por Julkunen et al (2012). Eles evidenciaram também que pacientes com nefrite ativa apresentaram níveis mais elevados de anti-C1q e níveis mais baixos de C3 e C4 do que os pacientes com nefrite inativa ($p = 0,003-0,018$) o que levou eles a sugerirem que anti-C1q juntamente com o complemento C3 e C4 podem auxiliar no monitoramento de nefrite lúpica.

O nosso estudo observou também uma correlação negativa entre os valores de C3 e C4 com o Índice SLEDAI-2k (-0,484 e -0,708, respectivamente) e com valores de p significativos (0,080 e 0,005, respectivamente).

O grupo LESAMA apresentou medianas de C3 e C4 inferiores as medianas do grupo LESABA, o que sugere uma hipocomplementemia, resultado esse que condiz com uma maior atividade no primeiro grupo. O LESAMA apresentou também maiores níveis de ureia, o que pode sugerir um dano renal.

A quantificação de MPs foi feita a partir da marcação com anexina V, a qual evidencia PS presente na superfície das MPs. Baseando nesta análise não foi observado diferença estatística entre o número de MPs nos diferentes grupos de estudo analisados. Resultado semelhante foi encontrado por Nielsen et al. (2011) os quais relataram que MPs são encontradas em frequências semelhantes em pacientes com LES e controles.

As MPs tem sido associadas a comunicação intracelular e também responsáveis por processos inflamatórios e patológicos. Estudos sugerem que MPs podem ser responsáveis por várias doenças, tais como: malária (MPs plaquetárias e monocíticas), insuficiência cardíaca (MPs endoteliais), artrite, HIV, insuficiência renal, distúrbios de coagulação (MPs plaquetárias). Podendo estarem aumentadas também após exercícios físicos (BOILARD et al, 2010; CORRALES-MEDINA et al, 2010; PANKOUI-MFONKEU, 2010).

Os grupos LESABA, LESAMA e ODA apresentaram diferenças significativas ($p < 0,10$), comparas com o grupos CT, nas MPs derivadas de células TCD4 (linfócitos) e células CD14 (monócitos) conforme visto na **Tabela 10**. MOBARREZ et al (2016) evidenciaram que MPs derivadas de plaquetas, endotélio e leucócitos no sangue dos pacientes com LES foram aproximadamente 2 a 7 vezes mais elevados do que nos controles.

Sabe-se que células TCD4 são responsáveis por modular a resposta imune celular, através da ativação e produção de citocinas, além de auxiliar na regulação de células TCD8 e na diferenciação de células B para a produção de anticorpos (DACA et al, 2011). Células TCD4 quando interagem com antígenos se tornam ativadas e se diferenciam em Th1, Th2 e Th17 (MIYAKE et al, 2011).

Kornek et al (2012) analisando MPs de pacientes com Hepatite C crônica evidenciaram maiores porcentagens de MPs derivadas de CD4 em comparação aos controles saudáveis (40% e 29%, respectivamente). Da mesma forma, eles evidenciaram também maiores níveis de MPs de CD8 em comparação a estes controles. Em nosso estudo não houve diferença significativa entre o nº de MPs nos diferentes grupos analisados.

O aumento de MPs derivadas de CD4 em pacientes com doenças autoimunes sugerem a importância dessas células na ativação das células B, as quais contribuem na patologia do LES através da produção de autoanticorpos, os quais formarão imunocomplexos (MOBARREZ et al 2016).

Embora no nosso estudo não encontramos presença de MPs endoteliais, Parker et al (2014) relatam a melhoria no controle do LES com supressão da inflamação após redução da presença de MPs endoteliais e observaram melhora no quadro de disfunção endotelial, o que sugere que o controle da atividade inflamatória da doença contribuiria para reduzir o risco cardiovascular ou o desenvolvimento de aterosclerose prematura no LES (MCCARTHY et al, 2016). MPs de origem endotelial são observadas no LES, mas não estão presentes em pacientes com Artrite Reumatoide e nem em pacientes com Esclerose Sistêmica (DIEKER et al, 2016).

Pacientes com LES e AR apresentam fatores que favorecem a liberação de MPs plaquetárias, tais como: ligantes da glicoproteína VI do receptor de colágeno, o receptor P2Y e o receptor Toll-like 4 (TLR 4), além de células eucarióticas ativadas (EVANS et al, 2009; BOILARD et al, 2010).

Segundo Gauley e Pisetsky (2010) e Pisetsky e Lipsky (2010) os receptores TLR3 e TLR4 de macrófagos podem induzir a liberação de MPs em um processo dependente do óxido nítrico (NO), pois a estimulação de TLR pode induzir apoptose.

Segundo Dye et al (2013) pacientes com LES, apresentaram MPs contendo IgG em sua superfície bem como aumento no número total de MPs. Evidenciaram também uma correlação entre o número de MPs contendo IgG e níveis de anti-DNA, sugerindo que em pacientes com LES, as MPs são importantes fontes de imunocomplexos.

Nielsen et al. (2011) evidenciaram que, em pacientes com LES, os níveis de MP que não se ligam à anexina V estão elevados no plasma dos pacientes, porém os níveis de MPs totais e MPs anexina-positivos estavam reduzidos em comparação com os controles. Os níveis de MPs plaquetárias e leucocitárias foram reduzidas em pacientes com LES. Ainda neste estudo, as MP derivadas de células não ligadas a anexina V correlacionaram-se bem com atividade da doença, nefrite ativa, hipertensão e trombose arterial. Um estudo subsequente do mesmo grupo demonstrou que os níveis de IgG, IgM e C1q estavam aumentados em MPs derivadas de células no sangue de pacientes com LES comparados com controles saudáveis, assim como pacientes com AR e ES, com exceção de MPs positivas para IgM em soros de AR (NIELSEN et al, 2012).

Em relação as MPs derivadas de células CD14, os grupos LESABA, LESAMA e ODA apresentaram diferença significativa ($p < 0,10$) em relação ao grupo CT. Segundo Liphaut et al (2013) pacientes adultos com LES apresentam apoptose acelerada e diminuição da sobrevivência de monócitos. Sendo que a apoptose é maior em pacientes com LES de moderada/alta atividade do que em pacientes com LES de baixa atividade, além disso evidenciaram também uma correlação entre a elevação de CD14 e atividade da doença lúpica. Níveis séricos de CD14 estão aumentados em algumas doenças autoimunes sistêmicas, como LES, AR e síndrome de Kawasaki (KITCHENS e THOMPSON, 2005).

Vinuela-Berni et al (2015) detectaram que pacientes com LES apresentaram MPs de monócitos, plaquetas, células endoteliais e linfócitos B significativamente aumentadas em comparação com controles. Porém diferentemente do encontrado em nosso estudo, onde não houve diferença significativa entre os grupos LESABAxLESAMA ($p=0,867$), MPs de CD14 foram significativamente maiores em pacientes com doença em moderada/alta atividade em comparação com pacientes com baixa atividade da doença, porém o estudo de Vinuela-Berni et al (2015) utilizou

SLEDAI-2k>40, para atividade da doença. Por fim, eles observaram que na análise de correlação entre os níveis de MP e a atividade da doença houve uma estreita correlação entre o valor do SLEDAI-2k e a porcentagem de todos os tipos de MPs estudados. Já nas MPs obtidas da urina não houve diferença entre os pacientes com LES e grupo controle.

Kornek et al (2012) evidenciaram contagem de CD14+CD16+ em pacientes com Hepatite C crônica o que indica ativação de monócitos e macrófagos inflamatórios. Além disso, eles observaram que houve uma correlação entre CD14+ e MPs derivadas de células NK nesses pacientes, o que ressalta uma ligação funcional entre a ativação destas células imunitárias em doentes com esteatose hepática.

Liphaus et al (2013) analisaram monócitos CD14 corados para o antígeno Fas, eles evidenciaram que pacientes jovens com LES apresentaram menores porcentagens de CD14 (mediana de 96,1%, variando de 93,1-97,8) quando comparados com indivíduos saudáveis (mediana de 97,4%, variando de 96,2- 98,3; valor de $p=0,02$). Além disso, observaram que 21 pacientes jovens com LES em atividade apresentam porcentagens reduzidas de células CD14 Fas+ (mediana de 93,4%, variando de 90,0–96,8) quando comparado com pacientes com doença sem atividade (mediana de 97,4%, variando de 96,1-98,0; $p=0,001$) e com indivíduos saudáveis (mediana de 97,4%, variando de 96,2-98,3; $p = 0,0007$). Antal-szalma et al (2001) observaram que pacientes com LES apresentam níveis aumentados de CD14 e uma correlação positiva com a atividade da doença. Liphaus et al (2012) especularam se CD14 estaria contribuindo com o desenvolvimento do LES em pacientes jovens, porém, isso não pôde ser confirmado, uma vez que seus pacientes apresentaram valores próximos ao grupo controle.

Vinuela-Berni et al (2015) observaram que o número de MPs derivados de monócitos, plaquetas, células endoteliais e linfócitos B estavam aumentadas em pacientes com AR em comparação com controles saudáveis. Além disso, embora os níveis urinários de MP monocitárias e plaquetárias tendessem a ser maiores em pacientes com AR em comparação com controles saudáveis, não foram observadas diferenças significativas nestes casos, bem como nos outros tipos de MPs detectados.

Com o intuito de avaliar se as MPs autólogas estimulariam as CMSP, quantificou-se IFN- γ e IL-10. A produção de IFN- γ por células TCD8 apresentou diferença significativa entre os grupos LESAMAxODA e ODAxCT. Evidenciando um aumento da produção de IFN- γ em pacientes do grupo ODA. Diferentemente do evidenciado em nosso estudo, Rana et al (2012) observaram que o IFN- γ estava elevado no soro de pacientes com LES. Em outro estudo avaliando tratamento de camundongos com IFN- γ , observou-se que o IFN- γ acelerou a doença enquanto a sua neutralização resultou em uma redução nos sintomas da doença e melhora da sobrevida, além disso, a deleção genética do receptor de IFN- γ nesses camundongos prejudicou a produção de autoanticorpos e o desenvolvimento de glomerulonefrite (SCHMIDT et al, 2015).

Mardani et al (2018), em um estudo realizado em camundongos, evidenciaram que em esplenócitos cultivados de camundongos com LES induzido, houve um aumento significativo nos níveis de produção de IFN- γ e IL-17 em comparação com os controles negativos (grupos saudáveis). Já o grupo de camundongos tratados com probióticos e prednisolona (pré-tratamento e tratamento), foi observado uma redução significativa nos níveis de IFN- γ e IL-17 em comparação com o grupo controle positivo (camundongos com LES sem tratamento) ($p < 0,0001$). O tratamento com probióticos e prednisolona não induziu qualquer diferença na produção de IL-10 em comparação com o grupo induzido por LES.

Importante ressaltar que em nosso estudo apenas as pacientes com LES faziam uso de prednisona.

Segundo Niewold e Ghodke-puranik (2015) a análise de CMSP de pacientes com LES mostraram que eles tinham significativamente mais IFN- γ em comparação com CMSP do grupo controle e que as células T de pacientes com LES produziram mais IFN- γ , o que induziu a ativação de monócitos. O que não foi evidenciado em nosso estudo.

Não foi observado diferença significativa na produção de IL-10 pelas células TCD4+ e TCD8+. Sabe-se que a IL-10, exerce um papel na resposta imune humoral com consequente produção de anticorpos e vem sendo associada a diferentes condições clínicas presentes no LES. Porém, a IL-10 não é uma citocina específica,

pois pode ser produzida por células Th1, Th2, Th17 e Treg, porém, sua superexpressão em pacientes com LES pode sugerir ativação de células Treg (MIYAKE et al, 2011).

Em um estudo realizado por Mozo et al (2014) pacientes com anticorpos anti-RNP+ (14,9%) apresentaram níveis séricos de IFN- α ($p=0,023$) e IL-10 ($p=0,016$) significativamente mais elevados quando comparados com pacientes com anticorpos anti-RNP-. Além disso, anticorpos anti-dsDNA+ foram associados a anti-RNP (1,32–27,93, $p=0,021$) e correlacionaram-se positivamente com IL-10 ($r=0,204$, $p=0,036$). Eles observaram ainda que os pacientes anti-RNP+, mas anti-dsDNA- apresentaram elevação nos valores de IL-10 e IFN- α , porém não houve associação com a atividade da doença, visto que o SLEDAI-2k desses pacientes foi menor que o SLEDAI-2k de pacientes também positivos para anti-dsDNA ($p=0,018$).

Não houve também diferença significativa na ativação de células CD4+, CD8+, CD14+ e CD19+ após estímulo de CMSP com MPs autólogas. O que sugere que mesmo com as MPs apresentando um importante papel na patogenia do LES, em nosso estudo, o estímulo *in vitro* sugere não induzir uma proliferação celular.

Sabe-se que as MPs podem estar aumentadas nos indivíduos em diferentes processos patológicos e fisiológicos, porém vários estudos tem demonstrado uma associação das MPs em doenças autoimunes, em especial LES e AR. Estudos recentes evidenciaram a importância das MPs em processos inflamatórios e produção de autoanticorpos em pacientes com LES, o que pode sugerir um papel das MPs na patogenia da doença. Diante disso, elas podem ser potencialmente importantes como marcadores para o monitoramento das populações celulares e do desencadeamento de processos inflamatórios decorrentes de uma atividade da doença.

7. CONCLUSÃO

Ao final deste estudo, pode-se concluir:

- Não foi possível observar diferenças no perfil de quantificação e/ou origem de MPs de pacientes com LES em baixa atividade quando comparadas com pacientes com LES em moderada/alta atividade. Também não foi possível diferenciar o perfil de estímulo por MPs nas CMSP das participantes dos grupos LESABA, LESAMA e ODA.
- Não houve diferença significativa ($p=0,302$) na quantificação total de MPs entre os diferentes grupos analisados (CT, LESABA, LESAMA e ODA).
- Houve diferença significativa ($p=0,008$) na quantificação de MPs originadas de células TCD4, entre os grupos LESABA, LESAMA e ODA com o grupo CT, podendo sugerir que talvez exista uma associação de MPs TCD4 positivas com a patogênia em doenças autoimunes.
- Houve diferença significativa ($p=0,027$) na quantificação de MPs originadas de células CD14, entre os grupos LESABA, LESAMA e ODA com o grupo CT, o que sugere uma participação de MPs de origem CD14 positivas em doenças autoimunes.
- As CMSP de pacientes do grupo ODA quando comparadas com as de pacientes dos grupos CT e LESAMA, apresentaram níveis significativos ($p=0,032$ e $p=0,045$, respectivamente) de produção de IFN- γ por células CD8+ após o estímulo com MPs autólogas.
- Não houve diferença significativa nos níveis de produção de IFN- γ por células CD4+.
- Não houve diferença significativa nos níveis de produção de IL-10 por células CD4+ e CD8+.
- Não houve diferença significativa na ativação de células CD4+, CD8+, CD14+ e CD19+ após estímulo de CMSP com MPs.

O presente estudo sugere que as MPs podem estar associadas ao desenvolvimento do LES, as quais poderão ser utilizadas, no futuro, como marcadores de processos inflamatórios. Dessa forma, acreditamos na necessidade de se realizar

mais estudos com o objetivo de se conhecer melhor a participação das MPs na patogenia do LES.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS:

O presente trabalho apresenta como perspectivas futuras:

- Aumentar o N amostral com o intuito de caracterizar as MPs presentes nos pacientes com LES, e consequentemente possibilitar eliminar interferentes interespecíficos de cada paciente.
- Com um N amostral maior será possível estratificar os grupos de pacientes, não só pela pontuação do índice SLEDAI-2k, mas também pelos principais sintomas pontuados, o que permitirá avaliar se existe variação de MPs decorrente da sintomatologia dos pacientes e se estas exercem interferência no prognóstico da doença.
- Avaliar a interferência das principais classes de medicamentos utilizados pelas pacientes na quantificação e perfil de MPs, com o objetivo de se avaliar possíveis correlações.

REFERÊNCIAS

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

ALLAM, R.; ANDERS, H.J. The role of innate immunity in autoimmune tissue injury. **Current Opinion in Rheumatology**, v.20, n.5, p.538–544, 2008.

ANTAL-SZALMA, S.P.; SZO"LLÓSI, I.; LAKOS, G.; et al. A novel flow cytometric assay to quantify soluble CD14 concentration in human serum. **Cytometry**, v.45, p.115-123, 2001.

ARRAUD, N.; GOUNOU, C.; LINARES, R.; BRISSON, A.R. A simple flowcytometry method the detection of phosphatidylserine-exposing extracellular vesicles. **Journal Thrombosis and Haemostasis**, v.13, p.237-247, 2015.

ARRAUD, N.; LINARES, R.; TAN, S.; GOUNOU, C.; PASQUET, J.M.; MORNET, S.; BRISSON, A.R. Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. **Journal Thrombosis and Haemostasis**, v.12, n.5, p. 614-627, 2014.

ASSIS, M.R.; BAAKLINI, C.E. Lupus Eritematoso Sistêmico. **Revista Brasileira Médica**, v.66, p. 274-285, 2009.

BACHER, N.; RAKER, V.; HOFMANN, C.; GRAULICH, E.; SCHWENK, M.; BAUMGRASS, R.; BOPP, T.; ZECHNER, U.; MERTEN, L.; BECKER, C.; STEINBRINK, K. Interferon-alpha suppresses cAMP to disarm human regulatory T cells. **Cancer Reserch**, v.73, n.18, p.5647–5656, 2013.

BASHAL, F. Hematological disorders in patients with systemis lupus erythematosus. **The Open Rheumatology Journal**, v.7, p. 87-95, 2013.

BERGHOFER, B.; HALEY, G.; FROMMER, T.; BEIN, G.; HACKSTEIN, H. Natural and synthetic TLR7 ligands inhibit CpG-A- and CpG-C-oligodeoxynucleotide-induced IFN-alpha production. **Journal Immunology**, v.178, n.1, p.4072–4079, 2007.

BOBRIE, A.; COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THERY, C. Exosome secretion: Molecular mechanisms and roles in immune responses. **Traffic**, v.12, p.1659-1668, 2011.

BOILARD, E.; BLANCO, P.; NIGROVIC, P.A. Platelets: active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. **Nature Reviews Rheumatology**, v.8, n.1, p.534-542, 2012.

BOILARD, E.; NIGROVIC, P.A.; LARABEE, K.; WATTS, G.F.; COBLYN, J.S.; WEINBLATT, M.E.; MASSAROTTI, E.M.; REMOLDO'DONNELL, E.; FARNDAL, R.W.; WARE, J.; LEE, D.M. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. **Science**, v.327, p.580-583, 2010.

BOMBARDIER, C.; GLADMAN, D.D.; UROWITZ, M.B.; CARON, D.; CHANG, C.H. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The committee on prognosis studies in SLE. **Arthritis and Rheumatism**, v.35, n.6, p.630-640, 1992.

BORBA, E.F.; LATORRE, L.C.; BRENOL, J.C.T.; KAYSER, C.; DA SILVA, N.A.; ZIMMERMANN, A.F.; DE PÁDUA, P.M.; COSTALLAT, L.T.; SATO, E.I. Consenso de Lupus Eritematoso Sistêmico - Consensus of Systemic Lupus Erythematosus. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.55, n.1, p.196-207, 2008.

BOSCH, X. Systemic lupus erythematosus and the neutrophil. **New England Journal of Medicine**, v.365, p.758–760, 2011.

CAMPOS, F.M.F.; FRANKLIN, B.S.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; FILHO, A.L.S.; DE PAULA, S.C.; FONTES, C.J.; BRITO, C.F.; CARVALHO, L.H. Augmented plasma microparticles during acute *Plasmodium vivax* infection. **Malaria Journal**, v.9, p.327, 2010.

CARROLL, M.C. A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews Immunology**, v.4, p.825–831, 2004.

CARTER, E.E.; BARR, S.G.; CLARKE, A.E. The global burden of SLE: prevalence, health disparities and socioeconomic impact. **Nature Reviews Rheumatology**, v.12, n.1, p. 605-620, 2016.

CASH, H.; RELLE, M.; MENKE, J.; BROCHHAUSEN, C.; JONES, S.A.; TOPLEY, N.; GALLE, P.R.; SCHWARTING, A. Interleukin 6 (IL-6) deficiency delays lupus nephritis in MRL-Fas lpr mice: the IL-6 pathway as a new therapeutic target in treatment of autoimmune kidney disease in systemic lupus erythematosus. **Journal of Rheumatology**, v37, n1, p.60–70, 2010.

CERVERA, R.; ALBARCA-COSTALAGO, M.; ABRAMOVICZ, D.; ALLEGRI, F.; ANNUNZIATA, P.; AYDINTUG, A.O.; BACARELLI, M.R.; BELLISAI, F.; BERNARDINO, I.; BIERNAT-KALUZA, E.; BLOCKMANS, D.; BOKI, K.; BRACCI, L.; CAMPANELLA, V.; CAMPS, M.T.; CARCASSI, C.; CATTANEO, R.; CAULI, A.; CHWALINSKA-SADOWSKA, H.; CONTU, L.; COSYNS, J.P.; DANIELI, M.G.; D'CRUZ, D.; DEPRESSEUX, G.; DIRESKENELI, H.; DOMÈNECH, I.; ESPINOSA, G.; FERNÁNDEZ-NEBRO, A.; FERRARA, G.B.; FONT, J.; FRUTOS, M.A.; GALEAZZI, M.; GARCÍA-CARRASCO, M.; GARCÍA IGLESIAS, M.F.; GARCÍA-TOBARUELA, A.; GEORGE, J.; GIL, A.; GONZÁLEZ-SANTOS, P.; GRANA, M.; GÜL, A.; HAGA, H.J.; DE HARO-LIGER, M.; HOUSSIAU, F.; HUGHES, G.R.V.; INGELMO, M.; JEDRYKA-GÓRAL, A.; KHAMASHTA, M.A.; LAVILLA, P.; LEVI, Y.; LÓPEZ-DUPLA, M.; LÓPEZ-SOTO, A.; MALDYKOWA, H.; MARCOLONGO, R.; MATHIEU, A.; MOROZZI, G.; NICOLOPOULOU, N.; PAPASTERIADES, C.; PASSIU, G.; PERELLÓ, I.; PETERA, P.; PETROVIC, R.; PIETTE, J.C.; PINTADO, V.; DE PITA, O.; POPOVIC, R.; PUCCI, G.; PUDDU, P.; DE RAMÓN, E.; RAMOS-CASALS, M.; RODRÍGUEZ-ANDREU, J.; RUIZ-IRASTORZA, G.; SÁNCHEZ-LORA, J.; SANNA, G.; SCORZA, R.; SEBASTIANI, G.D.; SHERER, Y.; SHOENFELD, Y.; SIMPATICO, A.; SINICO, R.A.; SMOLEN, J.; TINCANI, A.; TOKGÖZ, G.; URBANO-MÁRQUEZ, A.; VASCONCELOS, C.; VÁZQUEZ, J.J.; VERONESI, M.; VIANNA, J.; VIVANCOS, J. Systemic lupus

erythematosus in Europe at the change of the millennium: lessons from the “Euro-Lupus Project”. **Autoimmunity Reviews**, v.5, n.3, p.180-186, 2006.

CHEN, L.; MORRIS, D.L.; VYSE, T.J. Genetic advances in systemic lupus erythematosus. **Current Opinion in Rheumatology**, v.29, n.5, p.423-433, 2017.

CHOI, J.; KIM, S.T.; CRAFT, J. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus an update. **Current Opinion in Immunology**, v.24, n.6, p.651-657, 2012.

CHOI, M.A.; FLOOD, K.; BERNATSKY, S.; RAMSEY-GOLDMAN, R.; CLARKE, A.E. A review on SLE and malignancy. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v.31, n.3, p.373-396, 2017.

CICARINI, W.B.; FERREIRA, K.S.; LOURES, C.M.G.; CONSOLI, R.V.; NEIVA, C.U.L.S.; PA´DUA, P.M.; NUNES, F.F.C.; ALVES, L.C.V.; REIS, E.A.; TOLEDO, V.P.C.P.; LWALEED, B.A.; CARVALHO, M.G. Systemic lupus erythematosus: disease activity may influence the release of endothelial microparticles? **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, V.29, P.189-195, 2018.

COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends Cell Biology**, v.19, n.1, p.43-51, 2009.

COJOCARU, M.; COJOCARU, I.M.; SILOSI, I.; VRABIE, C.D. Manifestations of systemic lúpus erythematosus. **Maedica**, v.6, n.4, p.330-336, 2011.

CORRALES-MEDINA, V.F.; SIMKINS, J.; CHIRINOS, J.A.; SERPA, J.A.; HORSTMAN, L.L.; JY, W.; AHN, Y.S. Increased levels of platelet microparticles in HIV-infected patients with good response to highly active antiretroviral therapy. **Journal Acquir Immune Defic Syndr**, v.54, p.217-218, 2010.

COSTA, L.M.; COIMBRA, C.C.B.E. lúpus eritematoso sistêmico: incidência e tratamento em mulheres. **Revista Uningá**, v.20, n.1; p.81-86, 2014.

COSTENBADER, K.H.; FESKANICH, D.; BENITO-GARCIA, E. Vitamin D intake and risks of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in women. **Annal Rheumatology Diseases**, v.67, n.4, p.530-535, 2008.

COSTI, L.R.; IWAMOTO, H.M.; NEVES, D.C.O.; CALDAS, C.A.M. Mortality from systemic lúpus erythematosus in Brazil: evaluation of causes according to the government health database. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.57, n.6, p.574-582, 2017.

CROOKSTON, K.P.; SIBBITT JR, W.L.; CHANDLER, W.L.; QUALLS, C.R.; ROLDAN, C.A. Circulating microparticles in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v.16, n.1, p.72-80, 2013.

DACA, A.; CZUSZYŃSKA, Z.; SMOLEŃSKA, Z.; ZDROJEWSKI, Z.; WITKOWSKI, Z.M.; BRY, E. 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. **Human Immunology**, v.72, n.12, p.1160-116, 2011.

DIEKER, J.; TEL, J.; PIETERSE, E.; THIELEN, A.; ROTHER, N.; BAKKER, M.; FRANSEN, J.; DIJKMAN, H.B.P.M.; BERDEN, J.H.; DE VRIES, J.M.; HILBRANDS, L.B.; DER VLAG, J.V. Circulating apoptotic microparticles in SLE patients drive the activation of DC subsets and prime neutrophils for NETosis. **Arthritis Rheumatology**, v.68, n.2, p.462-472, 2016.

DISTLER, J.H.; HUBER, L.C.; GAY, S.; DISTLER, O.; PISETSKY, D.S. Microparticles as mediators of cellular cross-talk in inflammatory disease. **Autoimmunity**, v.39, n.1, p.683-690, 2006.

DOLFF, S.; QUANDT, D.; WILDE, B.; FELDKAMP, T.; HUA, F.; CAI, X.; SPECKER, C.; KRIBBEN, A.; KALLENBERG, C.G.M.; WITZKE, O. Increased expression of costimulatory markers CD134 and CD80 on interleukin-17 producing T cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research and Therapy**, v.12, n.4, 2010.

DYE, J.R.; ULLAL, A.J.; PISETSKY, D.S. The role of Microparticles in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. **Journal of Immunology**, v.78, n.2, p.140-148, 2013.

EVANS, D.J.; JACKMAN, L.E.; CHAMBERLAIN, J.; et al. Platelet P2Y receptor influences the vessel wall response to arterial injury and thrombosis. **Circulation**, v.119, p.116-122, 2009.

FAIRHURST, A.M.; WANDSTRAT, A.E.; WAKELAND, E.K. Systemic lupus erythematosus: multiple immunological phenotypes in a complex genetic disease. **Advances Immunology**, v.92, p.1-69, 2006.

FAYYAZ, A.; IGOE, A.; KURIEN, B.T.; DANDA, D.; JAMES, J.A.; STAFFOIRD, H.A.; SCOFIELD, R.H. Hematological manifestations of lupus. **Lupus Science e Medicine**, v.2, n.1, p.2-18, 2015.

FLOWER, C.; HENNIS, A.J.M.; HAMBLETON, I.R.; NICHOLSON, G.D.; LIANG, M.H. Systemic lupus erythematosus in an African Caribbean population: incidence, clinical manifestations, and survival in the Barbados National Lupus Registry. **Arthritis Care Research**, v.64, n.8, p.1151-1158, 2012.

FORTIN, P.R.; CLOUTIER, N.; BISSONNETTE, V.; AGHDASSI, E.; EDER, L.; SIMONYAN, D.; LAFLAMME, N.; BOILARD, E. Distinct Subtypes of Microparticle-containing Immune Complexes Are Associated with Disease Activity, Damage, and Carotid Intima-media Thickness in Systemic Lupus Erythematosus. **The Journal of Rheumatology**, v. 45, n.7, p.2019-2025, 2016.

FRANÇA, C.N.; IZAR, M.C.O.; DO AMARAL, J.B.; TEGANI, D.M.; FONSECA, F.A.H. Microparticles as Potential Biomarkers of Cardiovascular Disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 104, n.2, p.169-174, 2015.

FREIRE, E.A.M.; SOUTO, L.M.; CICONELI, R.M. Medidas de Avaliação em Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.51; p.70-80, 2011.

FURST, D.E.; CLARKE, A.E.; FERNANDES, A.W.; BANCROFT, T.; GRETH, W.; IORGA, S.R. Incidence and prevalence of adult systemic lupus erythematosus in a large US managed-care population. **Lupus**, v.22, n.1, p.99-105, 2013.

GALINDO, C.V.F.; VEIGA, R.K.A. Características clínicas e diagnósticas do Lúpus Eritematoso Sistêmico: Uma Revisão. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.7, n.4; p.46-58, 2010.

GARCIA-ROMO GS, CAIELLI S, VEGA B, CONNOLLY J, ALLANTAZ F, XU Z, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. **Journal translational medicine**, v.3, p.73, 2011.

GAULEY, J.; PISETSKY, D.S. The release of microparticles by RAW 264.7 macrophage cells stimulated with TLR ligands. **Journal Leukocytes Biology**, v.87, p.1115-1123, 2010.

GOTTSCHALK, T.A.; TSANTIKOS, E.; HIBBS, M.L. Pathogenic inflammation and its therapeutic targeting in systemic Lupus erythematosus. **Frontiers in Immunology**, v.6, 2015.

GOULIELMOS, G.N.; ZERVOU, M.I.; VAZGIOURAKIS, V.M.; GHODKE-PURANIK, Y.; GARYFALLOS, A.; NIEWOLD, T.B. The genetics and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) in populations of different ancestry. **Gene**, v.668, p. 59-72, 2018.

GUIDUCCI, C.; GONG, M.; XU, Z.; GILL, M.; CHAUSSABEL, D.; MEEKER, T.; CHAN, J.H.; WRIGHT, T.; PUNARO, M.; BOLLAND, S.; SOUMELIS, V.; BANCHEREAU, J.; COFFMAN, R.L.; PASCUAL, V.; BARRAT, F.J. TLR recognition of self-nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. **Nature**, v.465, p.937–941, 2010.

HAPPONEN, K.E.; TRAN, S.; MÖRGELIN, M.; PRINCE, R.; CALZAVARINI, S.; ANGELILLO-SCHERRER, A.; DAHLBÄCK, B. The Gas6-Axl protein interaction mediates endothelial uptake of platelet microparticles. **Journal of Biological Chemistry**, v.291, n.20, p.10586-10601, 2016.

HIEPE, F.; DORNER, T.; HAUSER, A.E.; HOYER, B.F.; MEI, H.; RADBRUCH, A. Long-lived autoreactive plasma cells drive persistent autoimmune inflammation. **Nature Reviews Rheumatology**, v.7, n.1, p.170–178, 2011.

HIGGS, B.W.; LIU, Z.; WHITE, B.; ZHU, W.; WHITE, W.I.; MOREHOUSE, C.; BROHAWN, P.; KIENER, P.A.; RICHMAN, L.; FIORENTINO, D.; GREENBERG, S.A.; JALLAL, B.; YAO, Y. Patients, with systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis and scleroderma share activation of a common type I interferon pathway. **Annal Rheumatic Diseases**, v.70, n.1, p.2029-2036, 2011.

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

HONG, Y.; ELEFThERIOU, D.; HUSSAIN, A.A.; et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies stimulate release of neutrophil microparticles. **Journal Am Soc. Nephrol.**, v23, p.49-62, 2012.

IGHE, A.; DAHLSTROM, O.; SKOGH, T.; SJOWALL, C. Application of the 2012 Systemic Lupus International Collaborating classification criteria to patients in a regional Swedish Systemic Lupus Erythematosus register. **Arthritis Research and Therapy**, v.17, n.1, p.1-8, 2015.

JACQUEMIN, C.; SCHIMITT, N.; CONTIN-BORDES, C.; LIU, Y.; NARAYANAN, P.; SENESCHAL, J.; MAUROUARD, T.; DOUGALL, D.; DAVIZON, E.S.; DUMORTIER, H.; DOUCHET, I.; RAFFRAY, L.; RICHEZ, C.; LAZARO, E.; DUFFAU, P.; TRUCHETET, M.E.; KHORYATI, L.; MERCIE, P.; COUZI, L.; MERVILLE, P.; SCHAEVERBEKE, T.; VIALARD, J.F.; PELLEGRIN, J.L.; MOREAU, J.F.; MULLER, S.; ZURAWSKI, S.; COFFMAN, R.L.; PASCUAL, V.; UENO, H.; BLANCO, P. OX40 ligand contributes to human lupus pathogenesis by promoting T follicular helper response. **Immunity**, v.42, n.6, p.1159–1170, 2015.

JULKUNEN, H.; EKBL0M-KULLBERG, S.; MIETTINEN, A. Nonrenal and renal activity of systemic lupus erythematosus: a comparison of two anti-C1q and five anti-dsDNA assays and complement C3 and C4. **Rheumatology**, v.32, n.8, p.2445-2451, 2012.

JUNE, R.R; AGGARWAL, R. The use and abuse of diagnostic classification criteria. **Research clinical Rheumatology**, v. 28, n.6, p.921-934, 2014.

KELLEY, V.R.; WUTHRICH, R.P. Cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Seminars in Nephrology**, vol.19, n.1, p.57–66, 1999.

KITCHENS, R.L.; THOMPSON, P.A. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. **Journal End Research**, v.11, p.225-229, 2005.

KORNEK, M.; LYNCH, M.; MEHTA, S.H.; et al. Circulating microparticles as disease-specific biomarkers of severity of inflammation in patients with hepatitis C or nonalcoholic steato-hepatitis. **Gastroenterology**, v.143, p. 448-458, 2012.

KUHN, A.; BEISSERT, S. Photosensitivity in lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v.38, n.7, p.519-529, 2005.

KUHN, A.; BONSMANN, G.; ANDERS, H.J.; HERZER, P.; TENBROCK, K.; SCHEIDER, M. Diagnostic and Therapy of Systemic Lupus Erythematosus. **Dtsch Arztebl International**, v.112, p. 423-432, 2015.

KWOK, S.K.; LEE, J.Y.; PARK, S.H.; CHO, M.L.; MIN, S.Y.; PARK, S.H.; KIM, H.Y.; CHO, Y.G. Dysfunctional interferon-alpha production by peripheral plasmacytoid dendritic cells upon Toll-like receptor-9 stimulation in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research and Therapy**, v.10, n.1, 2008.

LANDE, R.; GANGULY, D.; FACCHINETTI, V.; et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. **Journal translational medicine**, v.3, p.19, 2011.

LATEEF, A.; PETRI, M. Hormone replacement and contraceptive therapy in autoimmune diseases. **Journal Autoimmun**, v.38, n.2, p.170-176, 2012.

LI, H.; LIN, S.; YANG, S.; CHEN, L.; ZHENG, X. Diagnostic value of serum complement C3 and C4 levels in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical Rheumatology*, v.34, n.3, p.471-477, 2015.

LIPHAUS, B.L.; KISS, M.H.B.; CARRASCO, S.; GOLDENSTEIN-SCHAINBERG, C. Reduced expressions of Fas and Bcl-2 proteins in CD14+ monocytes and normal CD14 soluble levels in juvenile systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 22, p.940-947, 2013.

LOOD, C.; BLANCO, L.P.; PURMALEK, M.M.; CARMONA-RIVERA, C.; DE RAVIN, S.S.; SMITH, C.K.; MALECH, H.M.; LEDBETTER, J.A.; ELKON, K.B.; KAPLAN, M.J. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. **Nature Medicine**, v.22, n.2, p.146–153, 2016.

MACK, M.; KLEINSCHMIDT, A.; BRUHL, H.; et al. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane- derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. **Nature**, v.6, p.769-775, 2000.

MANGAN, P.R.; HARRINGTON, L.E.; O'QUINN, D.B.; HELMS, W.S.; BULLARD, D.C.; ELSON, C.O.; HATTON, R.D.; WAHL, S.M.; SCHOEB, T.R.; WEAVER, C.T. Transforming growth factor- β induces development of the TH17 lineage. **Nature**, v.441, n.7090, p. 231–234, 2006.

MARDANI, F.; MAHMOUDI, M.; ESMAEILI, S.A.; KHORASANI, S.; TABASI, N.; RASTIN, M. In vivo study: Th1-Th17 reduction pristane- induce systemic lupus erythematosus mice after treatment with tolerogenic *Lactobacillus* probiotics. **Journal Cell Physiology**, p.1-8, 2018.

MARTIN, J.C.; BAETEN, D.L.; JOSIEN, R. Emerging role of IL-17 and Th17 cells in systemic lupus erythematosus. **Clinical Immunology**, v.154, n.1, p. 1-12, 2014.

MATHIAN, A.; HIE, M.; COHEN-AUBART, F.; AMOURA, Z. Targeting interferons in systemic lupus erythematosus: Current and Future prospect. **Drugs**, v.75, n.8, p.835-846, 2015.

MAUSE, S.F.; WEBER, C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. **Circulation Research**, v.107, n.9, p.1047-1057, 2010.

MCCARTHY, E.M; WILKINSON, F.L.; PARKER, B.; ALEXANDER, M.Y. Endothelial microparticles: Pathogenic or passive players in endothelial dysfunction in autoimmune rheumatic diseases? **Vascul. Pharmacology**, v.86, p.71-76, 2016.

MICHET, C.J.; JR MCKENNA, C.H.; ELVEBACK, L.R. Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. **Mayo Clinic Proceedings**, v.60, n.2, p.105-113, 1985.

MIKDASHI, J.; NIVED, O. Measuring disease activity in adults with systemic lupus erythematosus: the challenges of administrative burden and responsiveness to patient concerns in clinical research. **Arthritis Research and Therapy**, v.17, p. 183, 2015.

MINER, J.J.; KIM, A.H.J. Cardiac manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v.40, n.1, p.51-60, 2014.

MIRABELLI, G.; CANNARILE, F.; BRUNI, C.; VAGELLI, R.; LUCA, R.; CARLI, L. One year in review 2015: Systemic Lupus erythematosus. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v.33, n.3, p.414-425, 2015.

MIYAKE, K.; AKAHOSHI, M.; NAKASHIMA, H. Th subset balance in lupus nephritis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2011, 2011.

MOBARREZ, F.; VIKERFORS, A.; GUSTAFSSON, J.T.; GUNNARSSON, I.; ZICKERT, A.; LARSSON, A.; PISETSKY, D.S.; WALLEN, H.; SVENUNGSSON, E. Microparticles in the blood of patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE): phenotypic characterizations and clinical associations. **Scientific Reports**, v.6, n.36025, 2016.

MORAND, E.F.; MOSCA M. Treat to target, remission and low disease activity in SLE. **Clinical Rheumatology**, v.31, n.3, p.342-350, 2017.

MOREL L. Immunometabolism in systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews Rheumatology**, v.13, n.5, p.280-290, 2017.

MOREL, O.; JESEL, L.; FREYSSINET, J.M.; TOTI, F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.31, p.15-26, 2011.

MOZO, L.; LOPES, P.; CAMINAL-MONTERO, L.; RODRIGUEZ-CARRIO, J.; SUAREZ, A. Anti-ribosomal P antibodies are associated with elevated circulating IFN- α and IL-10 levels in systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, v.23, n.14, p.1477-1485, 2014.

MUNHOZ, R.P.; FAMELI, H.; TEIVE, H.A. Stiff person syndrome as the initial manifestation of systemic lupus erythematosus. **Movement Disorders**, v.25, n.4, p.516–517, 2010.

MURPHY, G.; ISENBERG, D. Effect of gender on clinical presentation in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v.52, n. 12, p. 2108-2115, 2013.

NAKASHIMA, C.A.K.; GALHARDO, A.P.; SILVA, J.F.M.; FIORENZANO, G.R.; SANTOS, A.B.S.; LEITE, M.F.S.; NOGUEIRA, M.A.; MENOLLI, P.V.S.; MENOLLI, R.A. Incidência e aspectos clínico-laboratoriais do lúpus eritematoso sistêmico em cidade do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.53, n.3, p.231-239, 2011.

NASONOV, E.; SOLOVIEV, S.; DAVIDSON, J.E.; LILA, A.; IVANOVA, R.; TOGIZBAYEV, G.; OMARBKOVA, Z.; SHEVCHUK, S.; IAREMENKO, O.; GNYLORYBOV, A.; SMAILOVA, Z.; CHERNOGOLOV, V.; MALYNOVSKA, K.; VASYLYEV, A.; PEREIRA, MH. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus (SLE) in selected cities from three Commonwealth of Independent States countries (the Russian Federation, Ukraine and Kazakhstan). **Lupus**, v.23, n.2, p.213–219, 2014.

NAUTA, A.J.; TROUW, L.A.; DAHA, M.R.; et al. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. **Europa Journal Immunology**, v.32, p.1726-1736, 2012.

NIELSEN, C.T.; OSTERGAARD, O.; JOHNSEN, C.; JACOBSEN, S.; HEEGAARD, N.H. Distinct features of circulating microparticles and their relationship to clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheumatic**, v.63, p.3067-3077, 2011.

NIELSEN, C.T.; ØSTERGAARD, O.; STENER, L.; IVERSEN, L.V.; TRUEDSSON, L.; GULLSTRAND, B.; JACOBSEN, S.; HEEGAARD, N.H. Increased IgG on cell-derived plasma microparticles in systemic lupus erythematosus is associated with autoantibodies and complement activation. **Arthritis Rheumatology**, v.64, n.4, p.1227-1236, 2012.

NIEWOLD, T.B.; GHODKE—PURANIK, Y. Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. **Journal of Autoimmunity**, v.64, p.125-136, 2015.

NOMURA, S.; SHIMIZU, M. Clinical significance of procoagulant microparticles. **Journal of Intensive care**, v.3, n.1, p.2, 2015.

OWENS, A.P.; MACKMAN, N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. **Circulation Research**, v.108, n.1, p.1284-1297, 2011.

PACHECO, Y.; BARAHONA-CORREA, J.; MONSALVE, D.M.; ACOSTA-AMPUDIA, Y.; ROJAS, M.; RODRIGUESZ, Y.; SAAVEDRA, J.; RODRIGUEZ-JIMENEZ, M.; MANTILLA, R.D.; RAMIREZ-SANTANA, C.; MOLANO-GONZALEZ, N.; ANAYA, JM. Cytokine and autoantibody clusters interaction in Systemic Lupus Erythematosus. **Journal translational medicine**, v.25, n.1, p.215-239, 2017.

PANKOUI-MFONKEU, J.B.; GOUADO, I.; FOTSO-KUATE, H.; ZAMBOU, O.; AMVAM-ZOLLO, P.H.; GRAU, G.E.; COMBES, V. Elevated cell-specific microparticles are a biological marker for cerebral dysfunctions in human severe malaria. **PLoS One**, v.5, p.13415, 2010.

PARKER, B.; AL-HUSAIN, A.; PEMBERTON, P.; YATES, A.P.; HO, P.; GORODKIN, R.; THE, L.S.; ALEXANDER, M.Y.; BRUCE, I.N. Suppression of inflammation reduces endothelial microparticles in active systemic lupus erythematosus. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.73, n.6, p.1144-1150, 2014.

PARKS, C.G.; COOPER, G.S.; HUDSON, L.L. Association of Epstein-Barr virus with systemic lupus erythematosus: Effect modification by race, age, and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 genotype. **Arthritis Rheumatology**, v.52, n.4, p.1148-1159, 2005.

PARKS, C.G.; D'ALUISIO, A.A.; SANDLER, D.P. Early life factors associated with adult-onset systemic lupus erythematosus in women. **Front Immunology**, v.7, p.1-7, 2016.

PARKS, C.G.; SANTOS, A.S.E.; BARBHAIYA, M.; COSTENBADER, K.H. Understanding the role of environmental factors in the development of systemic lupus erythematosus. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v.31, n.3, p.306-320, 2017.

PERL, A. Pathogenic mechanisms in systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v.43, n.1, p.1-7, 2010.

PETRI, M.; ORBAI, A.M.; ALARCON, G.S.; GORDON, C.; MERRILL, J.T.; FORTIN, P.R.; BRUCE, I.N.; ISENBERG, D.; WALLACE, D.J.; NIVED, O.; STURFELT, G.; RAMSEY-GOLDMAN, R.; BAE, S.C.; HANLY, J.G.; SANCHEZ-GUERRERO, J.; CLARKE, A.; ARANOW, C.; MANZI, S.; UROWITZ, M.; GLADMAN, D.; KALUNIAN, K.; COSTNER, M.; WERTH, V.P.; ZOMA, A.; BERNATSKY, S.; RUIZ-IRASTORZA, G.; KHAMASHTA, M.A.; JACOBSEN, S.; BUYON, J.P.; MADDISON, P.; DOOLEY, M.A.; VAN VOLLENHOVEN, R.F.; GINZLER, E.; SROLL, T.; PESCHKEN, C.; JORIZZO, J.L.; CALLEN, J.P.; LIM, S.S.; FESSLER, B.J.; INANC, M.; KAMEN, D.L.; RAHMAN, A.; STEINSSON, K.; FRANKS JR, A.G.; SIGLER, L.; HAMEED, S.; FANG, H.; PHAM, N.; BREY, R.; WEISMAN, M.H.; MCGWIN JR, G.; MAGDER, L.S. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v.64, n.8, p. 2677-2686, 2012.

PICKERING, M.C.; BOTTO, M.; TAYLOR, P.R.; LACHMANN, P.J.; WALPORT, M.J. Systemic lupus erythematosus, complement deficiency and apoptosis. **Advances Immunology**, v.76, n.1, p.227-324, 2000.

PISETSKY, D.S.; LIPSKY, P.E. Microparticles as adjuvants in the pathogenesis of SLE. **Nature Reviews Rheumatology**, v.6, n.6, p.368-372, 2010.

PISETSKY, D.S.; ULLAL, A.J.; GAULEY, J.; NING, T.C. Microparticles as mediators and biomarkers of rheumatic disease. **Rheumatology**, v.51, n.1, p.1737-1746, 2012.

PORTARIA 100, DE 7 DE FEVEREIRO DE 2013 - Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Lúpus Eritematoso Sistêmico.

RAMOS, P.S.; BROWN, E.E.; KIMBERLY, R.P.; LANGEFELD, C.D. Genetic factors predisposing to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. **Semin Nephrology**, v.30, n.2, p.164-176, 2010.

RANA, A.; MINZ, R.W.; AGGARWAL, R.; ANAND, S.; PASRICHA, N.; SINGH, S. Gene expression of cytokines (TNF-alpha, IFN-gamma), serum profiles of IL-17 and IL-23 in paediatric systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v.21, n.10, p.1105-1112, 2012.

RASMUSSEN, N.S.; JACOBSEN, S. Microparticles - culprits in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus? **Journal Expert Review of Clinical Immunology**, v.14, n.6, p.443-445, 2018.

RAVETCH, J.V.; BOLLAND, S. IgG Fc receptors. **Annual Review of Immunology**, v.19, p.275-290, 2001.

REES, F.; DOHERTY, M.; GRAINGE, M.; DAVENPORT, G.; LANYON, P.; ZHANG, W. The incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus in the UK, 1999-2012. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.75, n.1, p.136-141, 2016.

ROBSON, M.G.; WALPORT, M.J. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). **Clinical and Experimental Allergy**, v.31, n.5, p.678-685, 2001.

SCHMIDT, T.; PAUST, H.J.; KREBS, C.F.; TURNER, J.E.; KAFFKE, A.; BENNSTEIN, S.B.; et al. Function of the Th17/interleukin-17A immune response in murine lupus nephritis. **Arthritis Rheumatology**, v.67, n.2, p.475-487, 2015.

SCHUR, P.H.; GLADMAN, D.D. Overview of the clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in adults. **UptoDate**. 2011.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. **Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)**. Disponível em: <https://www.reumatologia.org.br/doencas/principais-doencas/lupus-eritematoso-sistemico-les/>. Acesso em: 10/03/2018.

STRICKLAND, F.M.; HEWAGAMA, A.; WU, A. Diet influences expression of autoimmune-associated genes and disease severity by epigenetic mechanisms in a transgenic mouse model of lupus. **Arthritis Rheumatology**, v.65, n.7, p.1872-1881, 2013.

THAPA, D.R.; TONIKIAN, R.; SUN, C.; LIU, M.; DEARTH, A.; PETRI, M.; PEPIN, F.; EMERSON, R.O.; RANGER, A. Longitudinal analysis of peripheral blood T cell receptor diversity in patients with systemic lupus erythematosus by next-generation sequencing. **Arthritis Research and Therapy**, v.17, n.1, p.132-140, 2015.

TOUMA, Z.; UROWITZ, M.B.; GLADMAN, D.D. SLEDAI-2k for a 30-day window. **Lupus**, v.19, n.1, p.49-51, 2010.

TRUEDSSON, L.; BENGTSSON, A.A.; STURFELT, G. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v.40, n.1, p.560-566, 2007.

TSOKOS, G.C. Systemic lupus erythematosus. **New England Journal of Medicine**, v.365, n.22, p.2110-2121, 2011.

ULLAL, A.J.; REICH, C.F.; CLOWSE, M.; CRISCIONE-SCHREIBER, L.G.; TOCHACEK, M.; MONESTIER, M.; PISETSKY, D.S. Microparticles as antigenic Targets of antibodies to dna and nucleosomes in systemic lupus Erythematosus. **Journal of Autoimmunity**, v.36, n.3-4, p.173-180, 2011.

VASQUEZ-CANIZARES, N.; WAHEZI, D.; PUTTERMAN, C. Diagnostic and prognostic tests in systemic lupus erythematosus. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v.31, n.3, p.351-363, 2017.

VIANNA, R.; SIMÕES, M.J.; INFORZATO, H.C.B. Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Revista Ceciliana**, v.2, n.1; p. 1-3, 2010.

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

VINUELA-BERNI, V.; DONIZ-PADILLA, L.; FIGUEROA-VEJA, N.; PORTILLO-SALAZAR, H.; ABUD-MENDOZA, C.; BARANDA, L.; GONZALEZ-AMARO, R. Proportions of several types of plasma and urine microparticles are increased in patients with rheumatoid arthritis with active disease. *Clinical and Experimental Immunology*, v.180, p.442-451, 2015.

VOSS, A.; LAUSTRUP, H.; HJELMBORG, J.; JUNKER, P. Survival in Systemic Erythematosus Lupus, 1995-2010. A prospective study in a Danish community. **Lupus**, v. 22, p. 1185-1191, 2013.

WALDSCHMIDT, T.J.; COOK, R.T.; KOVACS, E.J. Alcohol and inflammation and immune responses: summary of the 2006 alcohol and immunology research interest group (AIRIG) meeting. **Alcohol**, v.42, n.2, p.137-142, 2008.

WANG, H.; LI, T.; CHEN, S.; GU, Y.; YE, S. Neutrophil Extracellular Trap Mitochondrial DNA and Its Autoantibody in Systemic Lupus Erythematosus and a Proof-of-Concept Trial of Metformin. **Arthritis & Rheumatology**, v.67, n.12, p.3190-3200, 2015.

WEENING, J.J.; D'AGATI, V.D.; SCHWARTZ, M.M.; SESHAN, S.V.; ALPERS, C.E.; APPEL, G.B.; BALOW, J.E.; BRUIJN, J.A.; COOK, T.; FERRARIO, F.; FOGO, A.B.; GINZLER, E.M.; HEBERT, L.; HILL, G.; HILL, P.; JENNETTE, J.C.; KONG, N.C.; LESAVRE, P.; LOCKSHIN, M.; LOOI, L.M.; MAKINO, H.; MOURA, L.A.; NAGATA, M. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.15, n.2, p.241-250, 2004.

WEIDENBUSCH, M.; KULKARNI, O.P.; ANDERS, H.J. The innate immune system in human systemic lupus erythematosus. *Clinical Science*, v.131, n.8, p.625-634, 2017.

YOUNG, K.A.; MUNROE, M.E.; GUTHRIDGE, J.M. Combined role of vitamin D status and CYP24A1 in the transition to systemic lupus erythematosus. **Annal Rheumatology Diseases**, 2016.

ZACCAGNI, H.; FRIED, J.; CORNELL, J.; PADILLA, P.; BREY, R.L. Soluble adhesion molecule levels, neuropsychiatric lupus and lupus-related damage. **Frontiers Bioscience**, v.9, n.1, p.1654-1659, 2004.

ZIRNGIBL, M.; FÜRNRÖHR, B.G.; JANKO, C.; MUNOZ, L.E.; VOLL, R.E.; GREGORY, C.D.; SCHETT, G.; HERRMANN, M. Loading of nuclear autoantigens prototypically recognized by systemic lupus erythematosus sera into late apoptotic vesicles requires intact microtubules and myosin light chain kinase activity. **Clinical and Experimental Immunology**, v.179, n.1, p. 39-49, 2015.

ANEXOS:**Anexo I**

Critérios de Diagnóstico de Lúpus de acordo com o American College of
Rheumatology (ACR)

Critérios	Definição
Erupção malar	Eritema constante, plano ou elevado, sobre as eminências malares, tendendo para os sulcos nasolabiais.
Erupção discoide	Aumento de manchas eritematosas com descamação queratoide e tamponamento folicular; cicatrizes atróficas podem ocorrer em lesões mais antigas.
Fotossensibilidade	Erupção cutânea por reação anormal à exposição à luz solar, seja por relato do paciente ou observação médica.
Úlcera Oral	Ulceração oral ou nasofaríngeana, geralmente indolor, observada por médico.
Artrite	Artrite não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, associada à hipersensibilidade, tumefação e derrame.
Serosite	Pleurite – convincente histórico de dor pleurítica, ou atrito ouvido pelo médico ou evidência de derrame pleural. Pericardite – segundo ECG, ou atrito ou evidência de derrame pericárdico.
Distúrbio renal	Proteinúria persistente >0,5g/dia ou >3+. Cilindros celulares (hemático, granular, tubular ou misto).
Distúrbio neurológico	Convulsões – na ausência de drogas tóxicas ou distúrbios metabólicos. Psicose – na ausência de drogas tóxicas ou distúrbios metabólicos conhecidos.
Distúrbio hematológico	Anemia hemolítica com reticulocitose. Leucopenia - <4000/mm ³ em dois ou mais exames. Linfopenia - <1500/mm ³ em dois ou mais exames. Trombocitopenia - <100000/mm ³ na ausência de drogas tóxicas.
Distúrbios imunológicos	Presença de anticorpos anti-fosfolípidos. Anti-DNA. Anti-Sm. Testes sorológicos falso-positivos para sífilis por pelo menos 6 meses e confirmado por FTA-abs negativo.
Anticorpo antinuclear	Título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência ou teste equivalente em qualquer momento na ausência de drogas que sabidamente estão associadas com LES.

Anexo II

Critérios de Diagnóstico de Lúpus de acordo com o Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC)

Critérios	Definição
LES cutâneo agudo	Rash malar (não conta se discóide malar); Lúpus bolhoso; Variante de necrólise epidérmica tóxica do LES; Rash maculopapular do Lúpus; Rash fotossensível do Lúpus (Excluído dermatomiosite); Lúpus cutâneo subagudo (lesão psoriasiforme não indurada e/ou lesão anular policíclica com resolução sem deixar cicatriz, embora ocasionalmente com despigmentação pós-inflamatória ou telangiectasia)
LES cutâneo Crônico	Rash discóide clássico localizado (acima do pescoço) ou generalizado (acima e abaixo do pescoço); Lúpus hipertrófico (verrucoso); Paniculite lúpica (Lúpus profundo); Lúpus mucoso; Lúpus eritematoso túmido; Lúpus pérnio; Lúpus discóide (sobreposição com líquen plano)
Úlceras orais	Palato; Boca; Língua; Nasal (Na ausência de outras causas, tais como: vasculite, doença de Behçet, infecção (herpes vírus), doença inflamatória intestinal, artrite reativa e alimentos ácidos).
Alopécia não cicatricial	Fragilidade capilar ou queda difusa (na ausência de outras causas, como alopecia areata, drogas, deficiência de ferro e alopecia androgênica)
Artrite	Sinovite envolvendo duas ou mais articulações, caracterizada por edema ou efusão ou sensibilidade em duas ou mais articulações e trinta minutos ou mais de rigidez matinal.
Serosite	Dor pleurítica típica por mais de 1 dia; Derrames pleurais ou Atrito pleural; Dor pericárdica típica (dor com piora ao decúbito e melhora em posição de prece maometana) por mais de 1 dia; Derrame pericárdico ou atrito pericárdico ou Eletrocardiograma com sinais de pericardite (Na ausência de outras causas, como infecção, uremia e pericardite de Dressler).
Distúrbio renal	Relação proteína/creatinina urinárias (ou proteinúria de 24h) \geq 500mg/24h ou Cilindros hemáticos
Distúrbio neurológico	Convulsões; Psicose; Mononeurite múltipla (Na ausência de outras causas conhecidas tais como vasculite primária); Mielite; Neuropatia periférica ou de nervos cranianos (Na ausência de outras causas conhecidas como vasculite primária, infecção e diabetes mellitus); Estado confusional agudo (Na ausência de outras causas, como toxicas/metabólicas, uremia e drogas).
Anemia hemolítica	
Leucopenia	Leucopenia $<4.000/mm^3$ pelo menos uma vez (Na ausência de outras causas conhecidas, como síndrome de Felty, fármacos/substâncias ilícitas e hipertensão portal); Linfopenia $<1.000/mm^3$ pelo menos uma vez (Na ausência de outras causas conhecidas como corticosteróides, fármacos/substâncias ilícitas e infecção).

Trombocitopenia	Trombocitopenia <100.000/mm ³ pelo menos uma vez (Na ausência de outras causas conhecidas tais como fármacos/substâncias ilícitas, hipertensão portal e púrpura trombocitopênica trombótica).
FAN	Positivo (acima dos valores de referência).
Anti-DNA dupla hélice	Acima do valor de referência ou >2x o valor de referência se realizado pelo teste ELISA.
Anticorpo anti-Sm	Positivo
Anticorpo anti-fosfolipede	Anticoagulante lúpico; VDRL falso positivo; Anticardiolipina com títulos médios ou elevados (IgA, IgG ou IgM); Anti-Beta-2 Glicoproteína I (IgA, IgG ou IgM).
Redução de complemento	C3; C4; CH50.
Teste de Coombs positivo	Na ausência de anemia hemolítica

Anexo III

ÍNDICE DE ATIVIDADE DO LES – SLEDAI-2k (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index)

Soma: _____.

Pontos	Presença	Manifestação	Definição
8		Convulsão	De início recente, excluídas causa metabólicas, infecciosas e secundárias a fármacos.
8		Psicose	Distúrbio severo da percepção da realidade, excluídas causas metabólicas e drogas. Incluem alucinações, incoerências, perda marcada da associação de ideias, pensamento pobre, ilógico; comportamento bizarro, desorganizado ou catatônico.
8		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 com pelo menos 2 desses sintomas: perturbação da percepção, distúrbio incoerente, insônia ou hipersonia diurna, aumento ou redução da atividade psicomotora. Exclui: causas infecciosas, metabólicas e fármacos.
8		Distúrbios visuais	Alteração da retina caracterizada por corpos cistóides, hemorragias retinianas, exsudatos serosos ou hemorragias do plexo coroide ou neurite. Exclui: causas infecciosas, metabólicas e fármacos.
8		Comprometimento	Neuropatia sensorial ou motora, de início ou reinício recente.
8		Cefaléia lúpica	Severa e persistente, do tipo enxaqueca que não responde a analgésicos.
8		AVC	Excluir causa aterosclerótica.
8		Vasculite	Ulcerações, gangrenas, infartos periungueais, nódulos digitais dolorosos, áreas hemorrágicas subungueais, biópsia ou angiografia de qualquer área que confirme a vasculite.
4		Artrite	Envolvimento de duas ou mais articulações com sinais e sintomas inflamatórios.

4		Miosites	Dor ou fraqueza muscular proximal acompanhada de aumento de CPK/aldolase, eletromiografia alterada, biópsia compatível com miosite.
4		Cilindros urinários	Hemáticos ou granulosos.
4		Hematúria	>5 eritrócitos/ campo Excluir litíase renal e infecções.
4		Proteinúria	De início recente ou aumento de proteinúria já conhecido em mais de 0,5 g / 24 h.
4		Piúria	>5 leucócitos/ campo. Excluir infecções.
2		Rash cutâneo	Início recente ou recorrente de caráter inflamatório.
2		Alopecia	Início recente ou recorrente, excessiva, difusa ou localizada de perda de cabelos.
2		Úlcera mucosa	Início recente ou recorrente de úlceras nasais ou orais.
2		Pleurite	Dor pleurítica com atrito, derrame ou espessamento pleural.
2		Pericardite	Dor no peito, com atrito ou derrame pericárdico, confirmado por ecocardiograma.
2		Complemento baixo	CH50; C3 ou C4 abaixo dos valores de referência.
2		Anti-DNA	Acima dos valores de referência.
1		Febre	Temperatura acima de 38°C. Excluir infecção.
1		Trombocitopenia	<100000/mm ³
1		Leucopenia	<3000/ mm ³ . Excluir uso de fármacos.

Anexo IV

108

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



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

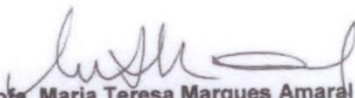
Projeto: CAAE – 01928412.8.0000.5149

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

DECISÃO

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

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


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo V



Universidade Federal de Minas Gerais
Hospital das Clínicas
Gerência de Ensino e Pesquisa

EBSERH
HOSPITAIS UNIVERSITÁRIOS FEDERAIS

Belo Horizonte, 04 de julho de 2016.

PROJETO DE PESQUISA nº 061/16: "Lúpus eritematoso sistêmico: aspectos hematológicos e imunológicos."

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas e a aprovação pelo COEP/UFMG em 27/06/12, esta Gerência aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional. Solicitamos enviar à GEP **relatório** parcial ou final após um ano.

Atenciosamente,

Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira
Gerente de Ensino e Pesquisa do HC-UFMG

Prof. Alexandre Rodrigues Ferreira
Gerente de Ensino e Pesquisa do HC/UFMG
Filial EBSERH
Insc. 181196 - PT: 937 de 17/11/14

Sr^a
Prof^a Maria das Graças Carvalho
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

Anexo VI

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: “Lúpus eritematoso sistêmico: aspectos hematológicos e imunológicos”

Prezado(a) Senhor(a),

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

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

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

Caso você não queira participar desta pesquisa não haverá qualquer prejuízo no seu tratamento. Toda informação obtida nessa pesquisa será mantida em segredo. Sua amostra de sangue deverá fazer parte de um banco de dados e de amostras

biológicas que poderão ser utilizadas no futuro para novas pesquisas. Todas as informações e amostras receberão um código de modo que ninguém saberá que esta amostra é sua, com exceção dos pesquisadores deste projeto. No entanto, qualquer pesquisa futura com o seu sangue deverá ser aprovada por um comitê de ética, sem necessidade de contactar você.

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

Desde já, agradecemos a sua colaboração!

Termo de consentimento

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

Nome completo

Assinatura

____ / ____ / ____
Data

Para contato:

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa Av. Antônio Carlos, 6627
Unidade Administrativa II - 2º andar
Sala 2005
Campus Pampulha
Belo Horizonte, MG - Brasil
31270-901

APÊNDICES:**APÊNDICE I:****PREPARO DE MEIO RPMI 1640 – pH 7,2
Meio Nutriente para Cultura de Células****Reagentes – para preparo de 1L de solução estoque**

• RPMI 1640	10,38g
• Bicarbonato de sódio	2,0g
• HEPES	2,4g
• Penicilina/Estreptomicina 10milUI/10mg/mL	5 mL
• Água miliq qsp	1000 mL

Procedimento:

1. Dissolver os reagentes sólidos em 900 mL de água miliq;
2. Adicionar o volume de antibiótico indicado;
3. Aferir o pH da solução com auxílio de fita de pH (pH deve ser 7,2);
4. Completar o volume da solução para 1,0L com água miliq;
5. Esterilizar o meio RPMI 1640 por filtração utilizando bomba de vácuo;
6. Fracionar a solução filtrada em frascos estéreis com capacidade de 500 mL;
7. Rotular os frascos (nome da solução, data de preparo, nome do responsável)
8. Armazenar os frascos contendo o meio a 2-8°C.

APÊNDICE II:**PREPARO DE SOLUÇÃO DE PBS
“Phosphate Buffered Saline”****Solução Estoque de PBS 10 X****Reagentes – para preparo de 1L de solução estoque**

- NaCl (cloreto de sódio): 84,15 g
- Na₂HPO₄ · H₂O (hidrogenofosfato dissódico monohidratado): 5,37 g
- KH₂PO₄ (dihidrogenofosfato de potássio): 14,69 g

Procedimentos

1. Adicionar 500 mL de água tipo I em um béquer e acrescentar os sais lentamente, sob agitação até completa solubilização;
2. Acertar pH = 7,4 (NaOH 1M ou HCL 1 M) com auxílio de pHmetro;
3. Transferir o volume total para uma proveta de 1 litro e completar o volume com água tipo I;
4. Estocar em temperatura de 2 a 8°C.

Preparo Solução NaOH 1M

Para 100 mL de solução: pesar 4g de NaOH e diluir em 100 mL de água destilada.

Solução de PBS 1 X

1. Diluir a solução de PBS 10 X na proporção 1:10, de acordo com o volume desejado. (ex.: para 1 L de solução de PBS 1X, diluir 100 mL de solução PBS 10X, em 900 mL de água destilada)
2. Acertar pH = 7,4
3. Esterilizar em autoclave ou filtração em filtros com membrana de 0,22µm.
4. Estocar em temperatura de 2 a 8°C.

APÊNDICE III:**PREPARO DE SOLUÇÃO DE PBS-W
“Phosphate Buffered Saline- Wash”****Reagentes – para preparo de 1L de solução**

- PBS 1x estéril 1000mL
- BSA – soro albumina bovina 5g
- Azida sódica 1g

Procedimentos

O PBS-W é o PBS 1x estéril ao qual se adiciona 0,5% de BSA e 0,1% de azida sódica.

1. Dissolver o BSA e a azida sódica, sob agitação e lentamente, evitando a formação de espuma.
2. Obedecer as proporções acima, por exemplo:
 - a. Preparo de 100 mL de PBS-W, adicionar ao PBS 1 x:
 - 0,1 g de azida sódica
 - 0,5 g de BSA
3. Acertar o pH para 7,2-7,4
4. Filtrar em 0,22 µm
5. Colocar em frasco transparente estéril e parafilmar dentro da capela de fluxo laminar
6. Conservar em temperatura de 2-8°C (geladeira)

APÊNDICE IV:**PREPARO DE SOLUÇÃO DE PBS-P
“Phosphate Buffered Saline- Perm”****Reagentes – para preparo de 1L de solução**

- PBS-W 1000mL
- Saponina 5g

Procedimentos

O PBS-P é o PBS-W ao qual se adiciona 0,5% de saponina.

1. Adicionar a saponina lentamente ao PBS-W, sob agitação, e deixar homogeneizar.
2. Obedecer as proporções acima, por exemplo:
 - a. Preparo de 100 mL de PBS-P, adicionar ao PBS-W 0,5 g de saponina
3. Acertar o pH para 7,2-7,4
4. Filtrar em membrana de 0,22 µm
5. Colocar em frasco transparente estéril e parafilmar dentro da capela de fluxo laminar
6. Conservar em temperatura de 2-8°C (geladeira)

APÊNDICE V:**PREPARO DE SOLUÇÕES ESTOQUE DE PARAFORMALDEÍDO (20X) E
CACODILATO DE SÓDIO (20X)****Reagentes – para preparo de 200mL de solução de Paraformaldeído (20x)**

- Paraformaldeído P.A. 40g
- Hidróxido de sódio P.A. 0,106g
- Água tipo 1 200mL

Procedimento

- Paraformaldeído (20x): realizar etapas em CAPELA de EXAUSTÃO
 1. Pesar 40g de paraformaldeído
 2. Aquecer 150mL de água tipo 1 em béquer com agitador
 3. Acrescentar 0,106g de hidróxido de sódio
 4. Esperar dissolver e continuar aquecendo até no máxima 70°C
 5. Acrescentar o paraformaldeído aos poucos para não precipitar
 6. Homogeneizar até a solução ficar completamente transparente
 7. Completar o volume da solução para 200mL com água tipo 1
 8. Fazer alíquotas de 2,5 mL
 9. Estocar a -20°C

Reagentes – para preparo de 200mL de solução de Cacodilato de sódio (20x)

- Cacodilato de sódio 40,04g
- Cloreto de sódio 26,6g
- Água tipo 1 200mL

Procedimento

- Cacodilato de sódio (20x):
 1. Pesar 40,04g de cacodilato de sódio
 2. Pesar 26,6g de NaCl
 3. Em um béquer, adicionar 150mL de água tipo 1
 4. Adicionar o NaCl pesado à água e homogeneizar utilizando um bastão de vidro ou barra magnética até completa dissolução

5. Acrescentar o cacodilato de sódio pesado aos poucos e homogeneizar utilizando um bastão de vidro ou barra magnética até completa dissolução
6. Completar o volume para 200mL
7. Fazer alíquotas de 2,5 mL
8. Estocar a -20°C

PREPARO DE SOLUÇÃO FIXADORA MACS FACS FIX (MFF)

Reagentes – para preparo de 100mL de solução

- Paraformaldeído 20x 5mL
- Cacodilato de sódio 20x 5mL
- Água bidestilada qsp 100mL

Procedimento

1. Aquecer o paraformaldeído 20x em banho-maria a 56°C até completa solubilização (transparente).
2. Descongelar o cacodilato de sódio 20x à temperatura ambiente.
3. Misturar o paraformaldeído com o cacodilato, usando alíquotas de mesmo volume e completar para 10 vezes o volume inicial com água bidestilada.
4. Acertar o pH para 7,2 -7,4.
5. Filtrar e armazenar em frasco âmbar em geladeira (2°C-8°C). A validade da solução é de **7 dias**.