

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

LUAN CARLOS VIEIRA ALVES

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS NO LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Belo Horizonte

2018

LUAN CARLOS VIEIRA ALVES

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS NO LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO**

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

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

Coorientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho

Belo Horizonte

2018

A474a Alves, Luan Carlos Vieira.
Avaliação de biomarcadores inflamatórios no Lúpus Eritematoso Sistêmico / Luan Carlos Vieira Alves – 2018.

110 f. : il.

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

Coorientadora: Maria das Graças Carvalho.

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. Biomarcadores – Teses. 4. Citometria de fluxo – Teses.

I. Toledo, Vicente de Paulo C. P. de. II. Carvalho, Maria das Graças. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.079



FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

LUAN CARLOS VIEIRA ALVES

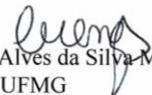
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 18 de maio de 2018, pela banca constituída pelos membros:


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


Prof. Maria das Graças Carvalho
UFMG


Prof. Débora Cerqueira Calderaro
UFMG


Prof. Cristiane Alves da Silva Menezes
UFMG

Belo Horizonte, 18 de maio de 2018.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pela vida e pela dádiva de conhecer e conviver com pessoas excelentes, pois sozinho, não chegamos à lugar nenhum.

Aos meus pais, em especial a minha mãe, que sempre fez o impossível para que eu alcançasse meus sonhos.

Aos meus tios, João e Anilda, que me acolheram como um filho.

Ao meu padrasto Waldir, que sempre me apoiou junto a minha mãe.

Aos meus irmãos, pelo apoio e por acreditarem em mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo, pelo companheirismo, pela compreensão, por me receber de braços abertos nesta etapa, pela sempre e cordial disponibilidade e atenção. Agradeço imensamente pelo projeto que me propôs. Muito obrigado professor, o senhor fez deste período o melhor possível e terá sempre o meu respeito e admiração.

À minha co-orientadora Prof.^a Dra. Maria das Graças Carvalho, pela compreensão, pela ajuda, pela disponibilidade, por me permitir participar do grupo de pesquisa em Lúpus ainda na graduação, como aluno de iniciação científica, por suas palavras de apoio e seu carinho. Muito obrigado professora, a senhora terá sempre meu respeito e admiração.

À Dra. Fernanda Freire Campos Nunes, pela ajuda incomensurável, companheirismo, apoio, disponibilidade e amizade.

À Prof.^a Dra. Tânia Mara Pinto Dabés, Guimarães, pela ajuda durante todo o mestrado, por sua disponibilidade e atenção.

À Prof.^a Dra. Héliida Monteiro Andrade, pela ajuda, pelo apoio e por disponibilizar insumos essenciais à realização das etapas experimentais do projeto.

À Dra. Gilda Aparecida Ferreira, pois sem seu apoio não seria possível concluir este projeto.

À médica reumatologista Joana Starling de Carvalho, pela ajuda durante o recrutamento dos pacientes, pelo apoio, companheirismo e amizade.

Aos colaboradores do HC-UFMG que viabilizaram a realização deste projeto. Dra. Cristina Lanna, Dra. Débora Cerqueira, Dra. Maria Raquel, Dra. Fabiana, Dra. Maria Fernanda, Dra. Rosa Weiss, Dr. Ricardo, Dr. Gustavo e Dr. Leandro.

Aos colaboradores do Centro de Pesquisa René Rachou, Dr. Olindo e Dra. Andréia, pela disposição dos equipamentos para a realização dos experimentos.

Aos técnicos e demais funcionários do Laboratório de Biomarcadores e da plataforma do CpRR, em especial a bióloga Lorena Júnia, pela ajuda nos experimentos, companheirismo, disposição e sua amizade.

Aos médicos residentes do HC-UFMG, ambulatório Bias Fortes, que nos ajudaram no recrutamento dos voluntários.

Aos funcionários, em especial a secretária Neusa Beata pela disposição e ajuda.

A todos os professores e funcionários do PPGACT, pelos conhecimentos e apoio durante o mestrado.

Aos amigos que fiz durante a iniciação científica, que sempre me apoiaram: Walter, Karine, Cristina e Marcos.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Clínica pela convivência, ajuda e apoio: Lilian, Edilene, Sr. Vicente, Augusto, Josimar.

Aos alunos de iniciação científica, Isabela, Luiz e Gabrielle, que foram de grande auxílio nas coletas.

Aos colegas do PPGACT pelos ótimos momentos, ajuda, companheirismo e conversas.

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

Por fim, agradeço a todos os voluntários, pacientes com LES, com outras doenças autoimunes e controles que se prontificaram em participar deste trabalho.

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune, multissistêmica, que acomete o tecido conjuntivo, com amplo espectro de manifestações clínicas e de etiologia pouco conhecida. A perda da tolerância imunológica leva a produção de autoanticorpos, depósitos teciduais de imunocomplexos, ativação do sistema complemento e processos inflamatórios crônicos. O diagnóstico atual estabelecido por meio de complexos critérios desenvolvidos pelo *American College of Rheumatology* aliado ao curso imprevisível do LES, com episódios de atividade e remissão, evidenciam a carência por biomarcadores específicos que auxiliem no diagnóstico e monitoramento desta patologia. Neste contexto, o presente estudo objetivou identificar, pela metodologia de CBA, os biomarcadores inflamatórios: ICAM-1, IL-8, IFN- α , IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 α , RANTES e VEGF em amostras de soro de pacientes portadores de LES e em grupos controles (portadores de outras doenças autoimunes e indivíduos saudáveis) e que pudessem auxiliar no diagnóstico da doença. Participaram deste estudo 134 voluntários, distribuídos no grupo LES, com 46 pacientes (22 pacientes com baixa atividade – SLEDAI 2k \leq 4; 24 pacientes com atividade moderada/alta – SLEDAI 2k $>$ 4), 42 pacientes controles com outras doenças autoimunes (grupo ODA) e 8 voluntários saudáveis (grupo CONTROLE). Foram identificados resultados promissores em 5 dos 9 biomarcadores avaliados. As quimiocinas MIG (p = 0,000), RANTES (p = 0,000) e IP-10 apresentaram resultados estatisticamente diferentes entre os pacientes com LES e controles saudáveis, sendo esta última quando avaliado em pacientes com LES diferentes níveis de atividade (LESBA:CONTROLE; p = 0,009 / LESAMA:CONTROLE; p = 0,023), enquanto as concentrações de IL-8 (p = 0,000) e MIP-1 α (p = 0,000) foram estatisticamente diferentes entre os pacientes com LES e com outras doenças autoimunes. As quimiocinas IL-8 (p = 0,026), IP-10 (p = 0,002), MIG (p = 0,037), MIP-1 α (p = 0,000) e RANTES (p = 0,037) correlacionaram-se com atividade do LES, apresentando níveis estatisticamente diferentes entre pacientes portadores de LES com baixa atividade e atividade moderada/alta. Correlações foram evidenciadas entre a idade dos pacientes com LES com os biomarcadores ICAM-1 (p = 0,009), IFN- α (p = 0,002) e MIG (p = 0,0014) e em relação a idade do grupo ODA, correlacionou-se com a quimiocina IL-8 (p = 0,049). Não evidenciamos resultados significativos nas análises de ICAM-1, IFN- α , MCP-1 e VEGF entre os grupos avaliados.

Palavras-chave: Lúpus Eritematoso Sistêmico. ICAM-1. IFN- α . IL-8. IP-10. MCP-1. MIG. MIP-1 α . RANTES. VEGF. Citometria de Fluxo.

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune, multisystemic disease that affects connective tissue, with a broad spectrum of clinical manifestations and poorly known etiology. The loss of immunological tolerance leads to autoantibody production, tissue deposits of immune complexes, complement system activation and chronic inflammatory processes. The current diagnosis, established through complex criteria developed by the American College of Rheumatology, allied to the unpredictable course of SLE, with activity and remission episodes, evidences the lack of specific biomarkers that aid in the diagnosis and monitoring of this pathology. In this context, the present study aimed to identify the inflammatory biomarkers ICAM-1, IL-8, IFN- α , IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 α , RANTES and VEGF in serum of patients with SLE and in control groups (carriers of other autoimmune diseases and healthy individuals) and that could also help in the diagnosis of the disease. A total of 134 volunteers, distributed in the SLE group with 46 patients (22 patients with low activity - SLEDAI 2k \leq 4, 24 patients with moderate / high activity - SLEDAI 2k $>$ 4. Forty-two patients with other autoimmune diseases) and 44 healthy volunteers (CONTROL group) took part in this study. Promising results were identified in five out of nine of the evaluated biomarkers. The chemokines MIG and RANTES showed statistically different results among SLE patients and healthy controls ($p = 0.0$ for both groups). IP-10 levels were significantly different in relation to the control group when evaluated in SLE patients at different levels of activity. The concentrations of IL-8 and MIP were statistically different between SLE patients and those with other autoimmune diseases ($p = 0.0$ for both cytokines in these groups). The chemokines IL-8 ($p = 0.026$), IP-10 ($p = 0.002$), MIG ($p = 0.037$), MIP-1 α ($p = 0.0$) and RANTES ($p = 0.037$) correlated with SLE activity showing statistically different levels among SLE patients with low or moderate/high activity. Correlations were evidenced in ages of SLE patients to ICAM-1, IFN- α and MIG biomarkers. On the other hand, concerning the ODA group, the age of individual in this group correlated only with chemokine IL-8. We did not observe significant results in ICAM-1, IFN- α , MCP-1 and VEGF analysis among evaluated groups.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus. ICAM-1. IFN- α . IL-8. IP-10. MCP-1. MIG. MIP-1 α . RANTES. VEGF. Flow-Cytometer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Fluxograma com o delineamento experimental.	46
Figura 2 -	Curvas-padrão para o painel BD™ Human soluble proteïn Master Buffer kit (ICAM-1 [CD54], INF-α, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIG, RANTES e VEGF) analisado utilizando o software FCAParray™.	55
Figura 3 -	Boxplot representativo da concentração sérica da molécula de adesão ICAM-1 em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$).	56
Figura 4 -	Boxplot representativo da concentração sérica da citocina IFN-α em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$).	57
Figura 5 -	Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina IL-8 (CXCL8) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$).	58
Figura 6 -	Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina IL-8 (CXCL8) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); e LES ($n = 46$).	58
Figura 7 -	Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina IP-10 (CXCL10) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$).	59
Figura 8 -	Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina MCP-1 (CCL2) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$).	60
Figura 9 -	Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina MIG (CXCL9) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$).	61
Figura 10 -	Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina MIG (CXCL9) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); e LES ($n = 46$).	61

- Figura 11 -** Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina MIP-1 α (CCL3) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$). **61**
- Figura 12 -** Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina MIP-1 α (CCL3) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); e LES ($n = 46$). **63**
- Figura 13 -** Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina RANTES (CCL5) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$). **64**
- Figura 14 -** Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina RANTES (CCL5) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); e LES ($n = 46$). **64**
- Figura 15 -** Boxplot representativo da concentração sérica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$). **65**
- Figura 16 -** Gráficos de dispersão apresentando as correlações entre as idades dos pacientes com LES e com as concentrações séricas de ICAM-1 (A), INF- α (B) e MIG (C); Idade dos pacientes com ODA com IL-8 (D). Dados analisados pelo teste de correlação Rô de Spearman (valores significantes: $p < 0,05$). **67**
- Figura 17 -** Gráficos de dispersão apresentando as correlações entre o SLEDAI 2k de pacientes com LES com as concentrações séricas de IL-8 (A), IP-10 (B), MIG (C), MIP-1 α (D) e RANTES (E). Dados analisados pelo teste de correlação Rô de Spearman (valores significantes: $p < 0,05$). **69**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Reagentes utilizados na técnica de CBA.	43
Tabela 2 -	Dados demográficos dos participantes do estudo.	48
Tabela 3 -	Critérios ACR apresentados pelos pacientes com LES no momento do diagnóstico. Dados obtidos dos prontuários médicos.	48
Tabela 4 -	Exames laboratoriais dos pacientes com LES e ODA. Dados obtidos dos prontuários médicos no momento da coleta.	50
Tabela 5 -	Exames laboratoriais complementares dos pacientes com LES e ODA. Dados obtidos dos prontuários médicos no momento da coleta	51
Tabela 6 -	Eritrograma e plaquetograma dos controles saudáveis e respectivas análises comparativas (teste de Mann-Whitney) com os grupos de pacientes.	52
Tabela 7 -	Medicamentos em uso pelos pacientes no momento da coleta. Dados obtidos dos prontuários.	53
Tabela 8 -	Relação dos principais biomarcadores selecionados segundo índice de significância ($p < 0,05$) na comparação entre grupos.	66

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

% – Porcento

> – Maior que

≤ – Menor ou igual a

® – Marca comercial registrada

μL – Microlitro

ACR – *American College Rheumatology*

ALT – Alanina Aminotransferase

Anti-DNA – Anticorpo anti-DNA

Anti-dsDNA – Anticorpo anti-DNA fita dupla

Anti-La/SSB – Anticorpo anti- antígeno La / *single stranded binding*

Anti-RNP – Anticorpo anti- ribonucleoproteína

Anti-Ro/SSA – Anticorpo anti- antígeno Ro / *single stranded annealing*

Anti-Sm – Anticorpo anti-Smith

APCs – Células apresentadoras de antígenos

AST – Aspartato Aminotransferase

C3 – Componente C3 do complemento

C4 – Componente C4 do complemento

CBA – *Cytometric Beads Array*

CD54 – *Cluster of differentiation 54*

CDs – Células dendríticas

CF – Citometria de Fluxo

CH50 – Complemento Hemolítico 50%

COEP – Comissão de Ética em Pesquisa

COPCORD – *Community Program for Control of Rheumatic Diseases*

CPqRR – Centro de Pesquisa René Rachou

dL – Decilitro

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DP – Desvio padrão

ELISA – *Enzyme-Linked ImmunoSobent Array*

FAFAR-UFMG – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais

FAN – Fator antinuclear

FAN-Hep2 – Fator antinuclear utilizando células Hep2

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

fL – Fentolitro

g/dL – Gramas por decilitro

GEP – Gerência de Ensino e Pesquisa

HCM – Hemoglobina Corpuscular Média

HC-UFMG – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA – *Human Leukocyte Antigen*

ICAM-1 – Molécula de Adesão Intercelular - 1

ICEx-UFMG – Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais

IFM – Intensidade de Fluorescência Média

IFN – Interferon

IFN- α – Interferon alfa

IFN- γ – Interferon gama

IL-1 – Interleucina 1

IL-8 – Interleucina 8

IP-10 – Proteína-10 induzida por interferon gama

ITGAM – Integrina Alfa M

kDa – Kilodalton

LBDM – Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico de Monitoração

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LES – Lúpus Eritematoso Sistêmico

LESAMA – Lúpus Eritematoso Sistêmico de atividade moderada/alta

LESBA – Lúpus Eritematoso Sistêmico de baixa atividade

MCP-1 – Proteína- 1 quimiotática de monócitos

MG – Minas Gerais

MHC – Complexo Maior de Histocompatibilidade

MIG – Monocina induzida por interferon gama

MIP-1 α – Proteína-1 alfa inflamatória de macrófagos

mL – Mililitro

mm³ – Milímetro cúbico

NL – Nefrite Lúpica

°C – Graus Célsius

ODA – Outras doenças autoimunes

PCR – Proteína C reativa

PE – Ficoeritrina

pg – Picograma

pg/mL – Picograma por mililitro

PR – Paraná

RANTES – Regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais

RDW – *Red Cell Distribution Width*

RN – Rio Grande do Norte

RNA – Ácido Ribonucleico

Ro52 – Antígeno Ro52

RPM – rotação por minuto

SLEDAI – *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*

SLICC – *Systemic Lupus International Collaborating Clinics*

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

™ – Marca registrada

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VCM – Volume Corpuscular Médio

VDRL – *Venereal Disease Research Laboratory*

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

VHS – Velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico	18
<i>1.1.1 Etiologia e fatores associados</i>	19
<i>1.1.2 Epidemiologia</i>	20
<i>1.1.3 Diagnóstico clínico e laboratorial</i>	22
1.1.3.1 SLEDAI	24
<i>1.1.4 Novas perspectivas para o diagnóstico laboratorial</i>	25
1.1.4.1 Pesquisa de citocinas	26
1.1.4.1.1 Interleucina 8 (IL-8)	27
1.1.4.1.2 Interferon- α (IFN- α)	28
1.1.4.1.3 Proteína-10 induzida por Interferon gama (IP-10)	29
1.1.4.1.4 Proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1)	29
1.1.4.1.5 Monocina induzida por Interferon gama (MIG)	30
1.1.4.1.6 Proteína-1 α inflamatória de macrófagos (MIP-1 α)	30
1.1.4.1.7 RANTES	31
1.1.4.1.8 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	31
1.1.4.2 Molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1)	32
1.2 Citometria de fluxo e CBA - Cytometric Bead Array	33
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos Específicos	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Normas éticas	39
4.2 Seleção de pacientes e de voluntários (controles)	39
<i>4.2.1 Critérios de inclusão</i>	40
4.2.1.1 LES	40
4.2.1.2 ODA	40
4.2.1.3 Controle	40
<i>4.2.2 Critérios de exclusão</i>	41
4.2.2.1 LES e ODA	41
4.2.2.2 CONTROLE	41
<i>4.2.3 Tamanho da amostra</i>	41

4.3 Análises laboratoriais	41
<i>4.3.1 Obtenção dos dados clínicos e laboratoriais</i>	42
<i>4.3.2 Obtenção das amostras</i>	42
<i>4.3.3 Dosagem dos biomarcadores inflamatórios por Citometria de Fluxo - CBA</i>	42
4.3.3.1 Preparo das amostras.....	43
4.3.3.2 Preparo da curva padrão.....	43
4.3.3.3 Preparo dos reagentes.....	43
4.3.3.4 Preparo das placas.....	44
4.3.3.5 Aquisição e análise dos dados.....	45
4.4 Análise estatística	45
4.5 Delineamento experimental	45
5. RESULTADOS	47
5.1 População do estudo	47
5.2 Dados laboratoriais	49
5.3 Medicamentos utilizados pelos pacientes sob tratamento	52
5.4 Dosagem dos biomarcadores por CBA	53
<i>5.4.1 ICAM-1</i>	56
<i>5.4.2 IFN-α</i>	56
<i>5.4.2 IL-8</i>	57
<i>5.4.4 IP-10</i>	59
<i>5.4.5 MCP-1</i>	60
<i>5.4.6 MIG</i>	60
<i>5.4.7 MIP-1α</i>	62
<i>5.4.8 RANTES</i>	63
<i>5.4.9 VEGF</i>	65
5.5 Resumo das avaliações dos biomarcadores	66
5.6 Correlações entre os biomarcadores avaliados com a idade e SLEDAI dos pacientes	67
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÃO	80
8. PERSPECTIVAS	81
REFERÊNCIAS	82
ANEXOS	101
ANEXO A – Critérios do American College of Rheumatology (ACR) para diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistêmico	101

ANEXO B – Critérios do <i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC)</i> para o diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico	103
ANEXO C – Índice de atividade utilizado no LES, SLEDAI (<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>).....	105
ANEXO D – Folha de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP.....	107
ANEXO E – Folha de aprovação do projeto de pesquisa pela Gerência de Ensino e Pesquisa do Hospital das Clínicas - UFMG	108
ANEXO F – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de amostras biológicas	109

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune inflamatória crônica multissistêmica com curso clínico variável, alternando entre períodos de quiescência e atividade da doença, de etiologia desconhecida, debilitante e fatal (FORTUNA & BRENNAN, 2013; MATHIAN *et al.*, 2015; MIRABELLI *et al.*, 2015). É ainda caracterizado pela perda da tolerância imunológica, produção de autoanticorpos contra antígenos nucleares e citoplasmáticos mediados por linfócitos B, reação de hipersensibilidade tipo III, devido a depósitos teciduais de imunocomplexos circulantes. A deposição de tais complexos resulta em um ambiente altamente suscetível a inflamações, expressando-se clinicamente de forma heterogênea e afetando diversos órgãos e tecidos (GOTTSCHALK *et al.*, 2015).

As manifestações clínicas do LES são diversificadas, variando desde sintomas gerais inespecíficos como febre, fadiga, artralgia e perda de peso, a sintomas utilizados nos critérios de diagnóstico como nefrite e alterações hematológicas (BASHAL, 2013).

As manifestações musculoesqueléticas são frequentes em pacientes com LES, sendo a artrite, artralgia, miopatias e osteonecrose as patologias mais recorrentes e comuns na apresentação clínica inicial da doença. Dentre as manifestações hematológicas, as principais alterações observadas são anemia, leucopenia, linfopenia e trombocitopenia, presentes em cerca de 20 - 80% dos pacientes, além da possibilidade de ocorrência de patologias associadas como anemia hemolítica, púrpura trombocitopênica trombótica e mielofibrose (COJOCARU *et al.*, 2011; FAYYAZ *et al.*, 2015).

Comprometimento renal é comum no LES, visto que quase todos os pacientes apresentam um certo grau de envolvimento renal, mas apenas 50% dos pacientes apresentam alterações clinicamente evidentes, sendo a nefrite lúpica (NL) uma das principais causas de morbidade e mortalidade. As manifestações cutâneas também são recorrentes e de grande importância para o diagnóstico do LES, sendo as mais frequentes *rash* malar, fotossensibilidade, lesões discóides e alopecia (COJOCARU *et al.*, 2011; YAP & LAI, 2015).

Outras manifestações podem acometer pacientes com LES, como alterações cardiovasculares, pericardite, miocardite, cardiomiopatias, doença valvar, serosite, vasculite, alterações pulmonares (pleurite, serosite, pneumonite lúpica, efusão pleural). Alterações

neuropsiquiátricas (relatadas em 25 a 75% dos pacientes) e endócrinas (afetando principalmente a tireoide), também são observadas em pacientes com LES (COJOCARU *et al.*, 2011; MINER & KIM, 2014).

A resposta imune inata pode contribuir tanto para lesões teciduais, via liberação de citocinas inflamatórias, quanto para a ativação exacerbada de linfócitos T e B, responsáveis por mediar processos inflamatórios e produção de autoanticorpos, além de exercer um papel importante na patogênese do LES, uma vez que, autoanticorpos específicos participam da formação de imunocomplexos facilitadores das reações inflamatórias localizadas (CHOI *et al.*, 2012).

Entretanto, os conhecimentos sobre a patogênese do LES ainda permanecem incompletos. As lacunas no entendimento de sua fisiopatologia repercutem diretamente no tratamento, tornando as terapias atuais limitadas, dependendo unicamente do uso de corticóides e drogas antiproliferativas tóxicas, elevando o risco de intoxicação (PERL, 2010).

1.1.1 Etiologia e fatores associados

Assim como a maioria dos distúrbios autoimunes, a etiologia do LES ainda permanece desconhecida devido, em parte, à sua alta complexidade. Entretanto, alguns fatores são apontados por contribuírem para o desenvolvimento da doença, tais como predisposição genética, fatores ambientais e hormonais (FORTUNA & BRENNAN, 2013; LONG *et al.*, 2016).

O LES apresenta um componente genético significativo com mais de 80 locis gênicos de susceptibilidade identificados, sendo que 85-90% destes locis não se encontram em uma região codificadora, indicando que regiões de regulação gênica alteradas possuem grande importância funcional para o desencadeamento da doença (CHEN *et al.*, 2017).

Mutações em genes responsáveis pela expressão do complexo maior de histocompatibilidade (MHC), de componentes da via clássica do complemento e que codificam nucleases estão fortemente associados ao LES. Outras associações observadas incluem o IRF5 (fator regulador de interferon), STAT4 (transdução de sinal e ativador de transcrição 4), ITGAM (Integrina alfa M) e polimorfismos de nucleotídeo único envolvidos na indução ou resposta a interferon (IFN) (O'NEILL & CERVERA, 2010; KAUL *et al.*, 2016).

As taxas de concordância entre gêmeos monozigóticos (24-58%) e dizigóticos (2%) e o fator hereditário (28%), indicam um importante papel do componente genético, mas isoladamente, não explica o fenótipo do LES, sugerindo desta forma a participação de mecanismos epigenéticos, como metilação, modificação de histonas e RNA não codificados, e/ou influência de fatores ambientais (DENG & TSAO, 2014; KAUL *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2017).

Os fatores ambientais associados ao LES incluem agentes biológicos, físicos e químicos. Dentre os agentes biológicos, destacam-se as infecções, principalmente por vírus (em especial pelo vírus Epstein-Barr), que devido ao mimetismo antigênico, podem levar à desregulação da resposta imune. (JAMES & ROBERTSON, 2012; FORTUNA & BRENNAN, 2013).

A radiação ultravioleta está envolvida no processo patológico do LES, causando fotossensibilidade e lesões cutâneas. Em razão do seu potencial em causar danos ao DNA, estimulação de linfócitos B e T, e produção de autoanticorpos e citocinas, a radiação ultravioleta é um fator que pode elevar o risco de desenvolvimento do LES (BARBHAIYA & COSTENBADER, 2014; KAUL *et al.*, 2016). Os agentes químicos que podem estar associados ao LES são compostos de exposição ocupacional, como sílica, solventes industriais, pesticidas e metais pesados. Entre os de natureza não ocupacional estão o cigarro, poluição do ar e medicamentos/drogas (por exemplo hidralazina e procainamida, que são capazes de induzir lúpus) (SARZI-PUTTINI *et al.*, 2005; PARKS *et al.*, 2017).

A hegemonia feminina na incidência do LES indica uma forte contribuição do fator hormonal, associado principalmente ao estrogênio, que pode ser agravado por terapia de reposição hormonal ou contraceptivas. O envolvimento hormonal pode favorecer os processos de ativação do sistema imune, aumento de produção de citocinas e atuar como fator ou cofator de transcrição e modulação da ativação de linfócitos (NTATSAKI & ISENBERG, 2015; KAUL *et al.*, 2016).

1.1.2 Epidemiologia

O LES é um distúrbio autoimune predominantemente feminino, com proporções que podem variar de 8 a 15:1 em relação ao gênero masculino (MURPHY; ISENBERG, 2013).

Populações hispânicas e de descendência africana são mais afetadas, quando comparadas a populações de origem europeia (caucasiana)(GONZÁLEZ *et al.*, 2013).

O LES pode se manifestar em qualquer idade, entretanto, a maioria dos pacientes se concentram na faixa de 16 a 55 anos, fato explicado por se tratar do período reprodutivo feminino (BERTSIAS *et al.*, 2012).

Conforme Carter *et al.* (2016), a incidência deste distúrbio, no mundo, é estimada em 0,3 a 31,5 casos por 100.000 habitantes a cada ano, sendo os menores índices observados em população do leste europeu e os maiores associados a populações com descendência afro-caribenha. Ainda segundo Carter *et al.* (2016), a prevalência mundial do LES varia entre 3,2 a 517,5 casos por 100.000 habitantes, tendo altos índices em populações americanas, regiões do sul europeu e asiático e no oriente médio.

Estudos conduzidos no Reino Unido mostraram declínio na taxa média de incidência da doença em sua população, de 5,10 casos por 100.000 habitantes em 1990 para 4,64/100.000 habitantes em 2012, representando uma queda de 1,8% ao ano. Entretanto, as taxas de prevalência do LES aumentaram ao longo destes anos, partindo de 64,99 casos por 100.000 habitantes (1999) para 97,04/100.000 habitantes em 2012, além de confirmarem o conhecimento que o lúpus acomete mais mulheres do que homens, bem como o fato da etnia afro-caribenha ser a mais propensa a desenvolver este distúrbio (REES *et al.*, 2016).

Furst *et al.* (2013) conduziram estudos em diversas regiões dos Estados Unidos ao longo de cinco anos (2003-2008), onde foi estimada uma incidência geral de 6,63 casos por 100.000 habitantes de LES no período, incidindo em maior escala sobre o gênero feminino (11,09/100.000 habitantes) em relação ao masculino (1,89/100.000 habitantes). A prevalência, assim como ocorreu nos estudos conduzidos por Rees *et al.* (2016) no Reino Unido, apresentou crescimento, sendo, em 2003, estimada em 81,07 casos por 100.000 habitantes elevando-se para 102,94/100.000 habitantes em 2008. Este crescimento da prevalência do LES pode estar associado à maior taxa de detecção da doença e ao aumento da sobrevivência dos pacientes, devido as melhorias nas estratégias de diagnóstico e tratamento nas últimas décadas.

No Brasil, os dados epidemiológicos acerca do LES são escassos, tendo sido realizados estudos nos estados do Rio Grande do Norte (RN), Minas Gerais (MG) e Paraná (PR). A incidência anual para a cidade de Natal/RN foi estimada em 8,7 novos casos por 100.000 habitantes (mulheres 14,1:100.000/ano; homens 2,2:100.000/ano), sendo diagnosticado em

pacientes com média de idade igual a 31,8 anos, conforme estudos realizados no ano 2000 (VILAR *et al.*, 2003). Para a cidade de Montes Claros, MG, em estudos realizados em 2003 utilizando a abordagem COPCORD (*Community Oriented Program for Control of Rheumatic Diseases*), foram observados 3 casos prevalentes, sendo 2 do gênero feminino (SENNA *et al.*, 2004). Estudos realizados em Cascavel/PR, por meio de revisão de prontuários do serviço de reumatologia local durante os anos de 2007 e 2008, revelaram incidência de 4,8 casos por 100.000 habitantes em pacientes com idade média de 41,5 anos (NAKASHIMA *et al.*, 2011).

Dados sobre a mortalidade em decorrência do LES mostram que, no Canadá, em estudo realizado com 1.000 pacientes, a taxa de mortalidade geral foi de 2,6 óbitos, sendo a maioria dos pacientes com idades superiores a 50 anos e resultante de infecções (LALANI *et al.*, 2010). No Brasil, em estudo conduzido entre os anos de 2002 a 2011, a taxa de mortalidade foi de 4,76 óbitos por 100.000 habitantes em pacientes com idade média de 40,7 anos (45,61% das mortes ocorreram entre 20 e 39 anos), sendo a maior incidência em mulheres (90,7%) e brancas (49,2%) (COSTI *et al.*, 2017).

1.1.3 Diagnóstico clínico e laboratorial

O diagnóstico do LES é estritamente complicado e desafiador, em razão de seus inúmeros e variáveis sintomas, que podem ser confundidos tanto com doenças infecciosas/inflamatórias, quanto com outras doenças autoimunes que apresentem sintomas constitucionais (artralgia, febre, fadiga) e específicos similares, como a artrite reumatóide (LEVY & KAMPHUIS, 2012; IGHE *et al.*, 2015).

O diagnóstico consiste em achados clínicos mediante anamnese, exame físico completo, e testes laboratoriais que incluem hemograma com contagem de plaqueta, contagem de reticulócitos, velocidade de hemossedimentação (VHS), perfil metabólico completo, teste de *Coombs* direto, transaminases hepáticas, fosfatase alcalina, urina rotina, proteinúria de 24hs, ureia e creatinina séricas, eletrólitos, albumina sérica, dosagem de bilirrubina, complemento (CH50, C3 e C4), proteína C reativa e avaliação de autoanticorpos (FAN, anti-DNA, anti-Sm, anti-cardiolipina, anticoagulante lúpico, anti-La/SSB, anti-Ro/SSA e anti-RNP) por imunofluorescência indireta. Para a individualização da abordagem, sinais e sintomas que possam afetar diferentemente cada paciente, o uso de outros recursos diagnósticos devem ser levados em consideração, como radiografias para avaliação do envolvimento articular, ósseo, torácico e pulmonar (MAIDHOF & HILAS, 2012; KUHN *et al.*, 2015).

O hemograma é uma importante ferramenta aplicada na avaliação de pacientes com LES, indicando várias alterações hematológicas comuns na doença, como anemias, evidenciadas em pacientes com baixos níveis de hemoglobina (< 12 g/dL para mulheres e 13.5 g/dL para homens) e hematócrito ($< 35\%$), bem como baixa contagem de eritrócitos no sangue periféricos (contagem inferior à 3.9×10^6 para mulheres e 4.3×10^6 para homens) associadas ou não a reticulocitose. A trombocitopenia (contagem de plaquetas inferior à 100×10^3 /dL) é também uma alteração frequente no LES, resultante da atividade da doença, sendo um fator de risco independente de aumento da mortalidade (BASHAL, 2013).

Outros achados de importância clínica no hemograma dos pacientes são leucopenia (contagem inferior a 4×10^3 /dL), linfopenia (contagem inferior à 1.5×10^3 /dL) e neutropenia (contagem inferior à 1×10^3 /dL), associados principalmente à atividade do LES e medicamentos, como micofenolato de mofetil e outros imunossupressores, além da redução de monócitos e eosinófilos circulantes (ALEEM, *et al.*, 2014; FAYYAZ *et al.*, 2015; SUBEDI *et al.*, 2015). Entretanto, pacientes podem apresentar quadro inverso, ou seja, leucocitose (contagem superior à 10×10^3 /dL), principalmente de granulócitos, em decorrência de infecções e/ou altas doses de esteroides (BASHAL, 2013).

O diagnóstico do LES, atualmente, baseia-se em critérios de classificação propostos em 1971, e revisados em 1982 (TAN *et al.*, 1982) e 1997 (HOCHBERG, 1997), pelo *American College of Rheumatology* (ACR) (ANEXO I), que se fundamenta na presença de, pelo menos, quatro dos onze critérios estabelecidos. São eles o eritema malar, lesões discóide, fotossensibilidade, úlceras orais/nasofaríngeas, serosite (pleurite ou pericardite), artrite (não-erosiva, com duas ou mais articulações acometidas caracterizada por dor, inchaço ou efusão), comprometimento renal (proteinúria persistente [$> 0,5$ g/dia ou $> 3+$] ou cilindrúria anormal), alterações hematológicas (anemia hemolítica, leucopenia – [$4.000/\text{mm}^3$ em duas ocasiões], linfopenia [$< 1.500/\text{mm}^3$ em duas ocasiões] e/ou plaquetopenia [$< 100.000/\text{mm}^3$]), alterações neurológicas (convulsões e psicose), alterações imunológicas (presença de anti-dsDNA, anti-Sm, e anticorpos antifosfolípidos) e positividade para anticorpos antinucleares. Este critérios possuem 83% de sensibilidade e 96% de especificidade (BORBA *et al.*, 2008; CUNHA & GILEK-SEIBERT, 2016).

Os critérios SLICC (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics*) (ANEXO II) propostos por Petri *et al.* (2012), com o objetivo de elevar a sensibilidade dos critérios diagnósticos no LES, consiste na inclusão nos critérios ACR, revisados em 1997, com o

acréscimo de sinais, sintomas e dados clínicos, que incluem: acometimento cutâneo (alopecia não cicatricial, outras lesões cutâneas, LES subagudo e vasculite cutânea), articular (rigidez matinal por mais de 30 minutos), renal (hematúria), neuronal (mielite, neuropatias cranial ou periférica, estado confuso agudo), imunológico (complemento baixo, teste de *Coombs* direto e anti- β 2 glicoproteína). O diagnóstico passa a ser concluído com a identificação de 4 ou mais critérios, sendo, pelo menos 1 clínico e 1 imunológico, ou biópsia renal com nefrite compatível com LES e FAN ou Anti-dsDNA positivo. Estes critérios possuem 97% de sensibilidade e 84% de especificidade (CUNHA & GILEK-SEIBERT, 2016). Os critérios ACR e SLICC podem ser aplicados em conjunto (KUHN *et al.*, 2015).

1.1.3.1 SLEDAI

A possibilidade de mensurar a atividade do LES é de grande importância tanto para a pesquisa clínica, quanto para a tomada de decisões acerca da conduta terapêutica a ser seguida (BOMBARDIER *et al.*, 1992; MIKDASHI & NIVED, 2015)

Com a finalidade de avaliar a atividade da doença no LES, desde o início da década de 80, vários índices de atividade, confiáveis e validados, foram propostos, dentre estes o SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*), introduzido em 1985, que consiste na pontuação das alterações apresentadas pelos pacientes, sendo que quanto maior a pontuação apresentada maior a atividade da doença com uma janela de no máximo 10 dias (TOUMA *et al.*, 2010; MIKDASHI & NIVED, 2015).

O SLEDAI é um dos índices mais aplicados para determinação da atividade do LES em centros de reumatologia. Este índice consiste em um questionário contendo 24 diferentes manifestações apresentadas por pacientes acometidos, sendo atribuída diferentes pontuações para cada ocorrência, variando de 1 a 8 pontos. A atividade é medida pela pontuação obtida pelo paciente, em que 0 (zero) assinala que o paciente não apresenta nenhuma das manifestações e 105 a pontuação máxima. Quanto maior a pontuação, maior a atividade da doença. As manifestações neuropsiquiátricas e vascular apresentam maior peso no SLEDAI (8 pontos para cada alteração). Entre essas estão a convulsão, psicose, síndrome cerebral orgânica, distúrbios visuais, distúrbio de nervos cranianos, acidente vascular cerebral, cefaleia lúpica e vasculite. As alterações musculoesqueléticas (artrite e miosite) e as renais (hematúria, proteinúria, piúria e cilindúria) pontuam 4 pontos cada. Por outro lado, pontuam com 2 pontos cada, as manifestações mucocutâneas (alopecia, úlceras de mucosa e *rash* malar), pleurite,

serosite, complemento baixo (CH50, C3 ou C4) e aumento de anti-dsDNA. Por fim, pontuam com 1 ponto cada, febre, trombocitopenia e leucopenia (linfopenia) (BOMBARDIER *et al.*, 1992; LAM & PETRI, 2005).

O SLEDAI-2K (também conhecido como SLEDAI-2000) (ANEXO III) é uma versão modificada do SLEDAI original introduzido em 2002, consistindo no mesmo princípio de pontuação, entretanto, permitindo uma janela de avaliação maior (30 dias, validado em estudo comparativo com a janela de 10 dias). O SLEDAI-2K, difere apenas na pontuação de alguns parâmetros, pontuando a persistência de alopecia, úlcera de mucosa, erupções cutâneas e proteinúria (superior a 0,5g/24 horas), em contrapartida da pontuação apenas no início dos sintomas no SLEDAI original (TOUMA *et al.*, 2010).

1.1.4 Novas perspectivas para o diagnóstico laboratorial

Eventos genéticos, biológicos, bioquímicos ou moleculares que se correlacionam com processos biológicos normais, patológicos ou resposta a uma intervenção terapêutica com capacidade de serem avaliados qualitativa e quantitativamente em laboratório podem ser definidos como biomarcadores (STRIMBU & TAVEL, 2011).

Os biomarcadores devem atender, após criteriosos testes laboratoriais, a uma série de exigências como ser biologicamente e fisiopatologicamente relevantes, simples para a prática de rotina e responder com precisão e sensibilidade às mudanças na atividade da doença (LIU & AHEARN, 2009).

A busca por biomarcadores que auxiliem no diagnóstico, monitoramento e resposta individual à terapêutica é de grande importância para o gerenciamento da doença em pacientes com LES, visto que, os atuais marcadores empregados no diagnóstico e monitoramento, possuem sensibilidade e especificidade variáveis, como o FAN (fator antinuclear). O FAN embora tenha uma sensibilidade alta (100%), possui uma especificidade relativamente baixa (65%), enquanto que, anticorpos anti-dsDNA e anti-Sm são altamente específicos, possuem baixa sensibilidade devido a sua transitoriedade (LIU *et al.*, 2013; ZENG *et al.*, 2017).

Assim como os autoanticorpos, os demais marcadores utilizados na rotina para o diagnóstico e monitoramento do LES possuem sensibilidade e especificidade limitadas, tais como a velocidade de hemossedimentação (VHS), proteína C reativa (PCR) e os níveis séricos de componentes do sistema complemento (C3 e C4) (ADHYA *et al.*, 2011).

Vários potenciais biomarcadores vem sendo associados com a susceptibilidade e patogênese do LES. Dentre os principais biomarcadores pesquisados estão os de origem genética, como genes de susceptibilidade (polimorfismos e genes relacionados ao sistema HLA – *Human Leukocyte Antigen*) e mecanismos epigenéticos (modificação de histonas, micro RNA e metilação de DNA), de origem metabólica (marcadores de estresse oxidativo, lipoproteínas de baixa densidade, lactato e perfis lipídicos) e marcadores imunológicos como produtos da ativação do complemento, autoanticorpos, além das citocinas que desempenham um papel importante na atividade da doença e na patogênese do LES (LIU *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2015; ZENG *et al.*, 2017).

A análise proteômica é uma importante ferramenta envolvida na pesquisa de potenciais biomarcadores em amostras biológicas menos invasivas (como soro e urina), que vem se destacando nas últimas décadas devido aos avanços tecnológicos, em especial, da espectrometria de massa (permitindo, de forma simultânea, a identificação e quantificação de milhares de proteínas em amostras biológicas complexas), e assim possibilitando a busca por proteínas ou peptídeos específicos que correlacionem com o início, a manifestação, progressão de uma doença ou em resposta a um tratamento (MISCHAK *et al.*, 2010; SHEN *et al.* 2014).

A proteômica permite uma análise comparativa de perfis proteicos entre diferentes grupos de estudos, como entre pacientes portadores de doenças autoimunes, em especial, o LES, e indivíduos saudáveis, favorecendo a descoberta de novos biomarcadores proteicos para um diagnóstico precoce, prognóstico ou tratamento (NICOLAOU *et al.*, 2017; PINNA *et al.*, 2017).

1.1.4.1 Pesquisa de citocinas

Citocinas são pequenas proteínas (5-20 kDa) envolvidas no processo de sinalização celular e regulação do sistema imune, recebendo nomenclaturas diferentes conforme a célula responsável por sua produção/secreção ou função exercida, como monocinas (citocinas produzidas por monócitos), linfocinas (citocinas produzidas por linfócitos), quimiocinas (citocinas com atividade quimiotáticas) e interleucina (produzida por leucócitos com ação sobre outros leucócitos) (ZHANG & JIANXIONG, 2007; HOLDSWORTH & GAN, 2015).

As citocinas possuem um importante papel mediador no processo inflamatório, atuando em respostas inflamatórias locais e sistêmicas, proliferação celular, reparo tecidual, envolvendo-se tanto em inflamações agudas quanto crônicas por meio de interações complexas,

apresentando, em alguns casos, ações contraditórias, devido ao fato de possuírem efeitos pró-inflamatórios e/ou anti-inflamatórios (DUQUE & DESCOTEAUX, 2014; TURNER *et al.*, 2014).

O LES está associado a processos de desregulação da resposta imune adaptativa (linfócitos B e T), mas evidências crescentes indicam a participação ativa da resposta imune inata (neutrófilos, células dendríticas, monócitos e macrófagos) na patogênese da doença, que junto à resposta adaptativa, são responsáveis pela produção de citocinas que orquestram o processo inflamatório, sendo que em pacientes com LES, em geral, há aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e redução daquelas anti-inflamatórias (APOSTOLIDIS *et al.*, 2011; DAVIS *et al.*, 2011).

Estudos apontam uma forte associação entre a desregulação da produção de citocinas e a fisiopatologia do LES, pois estas assumem um papel crítico na diferenciação, maturação e ativação celular, na perda da tolerância imunogênica, participando também dos processos inflamatórios locais que acarretam as lesões teciduais características da doença (POSTAL *et al.*, 2013; YAP & LAI, 2013).

O envolvimento das citocinas na patogênese do LES possui grande importância clínica, sobretudo na sua utilização como potenciais alvos terapêuticos, como por exemplo terapias com anti-TNF- α na artrite reumatóide, ou como biomarcadores para diagnóstico da atividade e gravidade da doença, bem como ferramentas auxiliares no diagnóstico da doença (YAP & LAI, 2010)

Dentre as várias citocinas associadas ao LES, estão a IL-8 (interleucina 8), IFN- α (Interferon alfa), IP-10 (proteína induzida por interferon gama), MCP-1 (proteína 1 quimiotática de monócitos), MIG (monocina induzida por interferon gama), MIP-1 α (proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa), RANTES (regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais) e VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), estando estas envolvidas na atividade da doença e dano tecidual, especialmente na evolução para nefropatias (ADHYA *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2013).

1.1.4.1.1 Interleucina 8 (IL-8)

A interleucina 8 (CXCL8) é membro da subfamília de quimiocinas C-X-C (principais mediadores da resposta inflamatória), secretada por várias células sanguíneas (macrófagos,

células epiteliais, linfócitos e neutrófilos), sendo o neutrófilos o principal alvo de sua ação (SHAHZAD *et al.*, 2010).

Estudos sugerem uma correlação positiva entre a concentração sérica de IL-8 e a atividade e agravamento do LES, visto que, pacientes com acometimento pulmonar (fibrose pulmonar), renal (nefrite) e neuropsiquiátrico apresentaram níveis elevados em comparação a controles saudáveis, indicando um importante papel modulador da IL-8 nos danos teciduais características da doença (ROVIN *et al.*, 2002; OKAMOTO *et al.*, 2010; NIELEPKOWICZ-GOŹDZIŃSKA *et al.*, 2014).

1.1.4.1.2 Interferon- α (IFN- α)

O IFN- α é uma glicoproteína, integrante da família dos interferons tipo 1, produzida por diversas células, como células dendríticas plasmocitoides, em resposta a patógenos (principalmente vírus), atuando na regulação da resposta imune inata e adaptativa, especificamente, na indução de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) e na ativação de células apresentadoras de antígenos (RÖNNBLUM & ELKON, 2010; NIEWOLD, 2011).

O IFN- α é associado a vários mecanismos fisiopatológicos do LES, dentre os quais, estão a perda da tolerância periférica por promover a maturação de células dendríticas (CDs), pois CDs imaturas são importantes na indução de anergia e na deleção de células T autorreativas, bem como na indução e manutenção de células T reguladoras (YAP & LAI, 2010; OHL & TENBROCK, 2011).

Outros mecanismos observados sob influência do IFN- α , são o aumento da expressão de autoantígenos (como o Ro52) e sua translocação seguida de subsequente apoptose, aumento da produção de anticorpos, mudança de classe isotípica, perda de seletividade de linfócitos B e capacidade de alterar a expressão gênica em pacientes com lúpus ativo (YAP & LAI, 2013).

Os níveis séricos de IFN- α estão aumentados em pacientes com LES, correlacionando com a atividade e agravamento da doença e a produção de autoanticorpos. Uma das explicações deste aumento se deve ao fato de imunocomplexos gerados a partir de autoantígenos e autoanticorpos ativarem células dendríticas, a principal produtora do IFN- α (YAP & LAI, 2013; KIM *et al.*, 2015; TAHERNIA *et al.*, 2017).

Em estudos realizados em pacientes sob tratamento com IFN- α (como em sarcoma de kaposi e hepatite C), observou-se o desenvolvimento de uma síndrome similar ao LES, sendo os sintomas minorados ao se interromper o tratamento, com alguns pacientes desenvolvendo autoanticorpos (DAVIS *et al.*, 2011; TAHERNIA *et al.*, 2017). Níveis séricos elevados de IFN- α são descritos como fatores de risco hereditários para o desenvolvimento do LES (NIEWOLD, 2011).

1.1.4.1.3 Proteína-10 induzida por Interferon gama (IP-10)

A IP-10 (CXCL10) é uma citocina pertencente à subfamília das quimiocinas C-X-C secretadas por células mononucleares de sangue periférico, células endoteliais fibroblastos, atuando sobre monócitos, células T e NK, além da regulação de linfócitos T, modulação e aumento da expressão de moléculas de adesão, inibição da angiogênese e no amadurecimento de células progenitoras na medula óssea (KONG *et al.*, 2009). O seu aumento está associado a doenças inflamatórias, como distúrbios autoimunes, bem como indicador de severidade de diversas doenças (LIU *et al.*, 2011).

Diversas manifestações do LES foram associadas a concentrações elevadas de IP-10, dentre estas, destacam-se as manifestações cutâneas, devido a maior síntese desta citocina por macrófagos e queratinócitos ativos no foco da lesão, bem como por aumentar o recrutamento de células dendríticas para o local da manifestação cutânea. Comprometimento pulmonar e renal também sugerem evidências significativas do papel fisiopatológico da IP-10 no Lúpus, em decorrência, principalmente, de sua ação quimiotática, apresentando uma correlação positiva com a atividade da doença (FU *et al.*, 2008; KONG *et al.*, 2009; ODLER *et al.*, 2016).

1.1.4.1.4 Proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1)

A quimiocina MCP-1 (CCL2) é um potente e importante fator quimiotático de monócitos membro da subfamília C-C (envolvidas no recrutamento celular), sendo produzida por diversas células como endoteliais, fibroblastos, epiteliais, monocíticas, muscular lisa, astrócitos, células mesangiais e microgliais em resposta ao estresse oxidativo, a fatores de crescimento ou citocinas, facilitando a migração e infiltração de monócitos/macrófagos, linfócitos T e de células NK no sítio inflamatório (DESHMANE *et al.*, 2009).

A MCP-1 está envolvida em várias doenças autoimunes, devido à sua atuação no recrutamento celular, sendo potencial alvo terapêutico em doenças como artrite reumatóide, esclerose múltipla e diabetes tipo 1 (DESHMANE *et al.*, 2009; YE *et al.*, 2005). No LES, estudos apontam um aumento desta quimiocina durante a atividade da doença, principalmente, em manifestações renais e cutâneas, em decorrência de sua ação quimiotática sobre monócitos/macrófagos que migram para o foco inflamatório, levando à injúria tecidual (LIU *et al.*, 2016; LEE & SONG, 2017). Níveis elevados de MCP-1 também foram encontrados em pacientes com manifestações neuropsiquiátricas (YOSHIO *et al.*, 2016).

1.1.4.1.5 Monocina induzida por Interferon gama (MIG)

MIG (CXCL9) é um fator quimioatratante de linfócitos T, produzido por monócitos e macrófagos, durante o processo inflamatório e no reparo de danos teciduais, atuando também na inibição da angiogênese, em tumores e metástase (BERTHOUD *et al.*, 2009; DUQUE & DESCOTEAUX, 2014). Infiltrados linfocíticos em válvulas e lesões cardíacas foram associados ao MIG em pacientes com doenças reumáticas (FAÉ *et al.*, 2013).

Estudos indicam níveis elevados de MIG em pacientes com LES, correlacionando-se significativamente com o score SLEDAI, associando-se, principalmente, a manifestações cutâneas, cardíacas e renais (BAUER *et al.*, 2006; LIT *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2010).

1.1.4.1.6 Proteína-1 α inflamatória de macrófagos (MIP-1 α)

A MIP-1 α (CCL3), é uma citocina pró-inflamatória da subfamília C-C envolvida nos processos de quimiotaxia, fagocitose e desgranulação, atuando na coordenação de respostas inflamatórias agudas e crônicas em locais de infecção ou lesão tecidual, principalmente pelo recrutamento celular, como monócitos, neutrófilos, células dendríticas e NK, por regulação do tráfego transendotelial (MAURER & VON STEBUT, 2004; DAPUNT *et al.*, 2014). Diversas células podem produzir MIP-1 α , sendo as principais os monócitos e macrófagos, quando estimulados por antígenos bacterianos (MENTEN *et al.*, 2002).

Alguns poucos estudos apontam correlação entre a MIP-1 α e o LES, na qual, além das funções desempenhadas pela citocina, evidenciada em sua forte associação com lesões discóides, demonstrou-se que esta possui efeito inibitório das ações de megacariócitos e aumento do nível sérico de trombopoietina em pacientes com lúpus, principalmente aqueles

que apresentavam anemia aplástica (VILÁ *et al.*, 2007; LU & NOSSENT, 2015). Pacientes com acometimento renal apresentam níveis séricos elevados de MIP-1 α , bem como tendências significantes de alterações hematológicas (BAUER *et al.*, 2006).

1.1.4.1.7 RANTES

RANTES (CCL5) é uma quimiocina membro da subfamília C-C com importante papel imunoregulador, com efeito quimiotático em linfócitos T e monócitos fundamental na iniciação e manutenção do processo inflamatório, sendo expressa por diversos tipos de células, principalmente por fibroblastos, monócitos, células endoteliais e algumas células epiteliais após ativação (KRENSKY & AHN, 2007; TAHARA *et al.*, 2009).

A quimiocina RANTES desempenha uma ampla importância clínica em diversas patologias, compreendendo as infecções (especialmente por HIV – vírus da imunodeficiência humana), câncer, aterosclerose, asma, transplantes (associado à rejeição do órgão), e doenças autoimunes, como a artrite reumatóide, sendo associado como preditor de susceptibilidade e atividade da doença, glomerulonefrites (associado à patogênese da doença) e esclerodermia. Em todas essas doenças, demonstrou-se um aumento do nível sérico desta citocina (KRENSKY & AHN, 2007; ELSAADANY *et al.*, 2011; GAMBICHLER *et al.*, 2011).

Pacientes com LES, segundo alguns estudos, apresentam níveis séricos de RANTES elevados, sugerindo correlação com a atividade da doença, em especial, atrelado às manifestações renais, como a nefrite lúpica, podendo ser sugerido como indicador de agravamento clínico, além de manifestações cutâneas, por contribuir para a cronicidade de infiltrados inflamatórios no tecido (VILÁ *et al.*, 2007; TIAN *et al.*, 2007; LU *et al.*, 2012; UVA *et al.*, 2012).

1.1.4.1.8 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

O VEGF é um potente agente angiogênico pertencente à família dos fatores de crescimento, capaz de induzir a proliferação, migração e permeabilidade de células endoteliais vasculares em resposta à hipóxia e outros diversos estímulos celulares (FERRARA, 2004; MOREIRA *et al.*, 2007). Esta citocina é secretada por células endoteliais, fibroblastos, células musculares lisas e macrófagos, estando envolvida em diversas patologias, como eczema e,

principalmente, tumores sólidos, correlacionando-se com o estágio e progressão da doença (SHIBUYA, 2014; SAMOCHOCKI *et al.*, 2016).

O VEGF desempenha um importante papel na patogênese do LES, atuando, em conjunto com outros fatores, no desencadeamento de diversos distúrbios que incluem alterações cardiovasculares, contribuindo para o desenvolvimento de quadros de vasculite, aterosclerose e doença arterial coronariana, bem como alterações renais, devido a danos ao endotélio glomerular resultando em nefrite (FELIERS, 2009; FRIERI, 2012; ZUBAIR & FRIERI, 2013; BĂRBULESCU *et al.*, 2015). Em pacientes com manifestações cutâneas do LES, nota-se também elevação nos níveis séricos de VEGF, principalmente naqueles onde se observa ulcerações de mucosa (ATERIDO *et al.*, 2017).

Pacientes com LES apresentam níveis séricos de VEGF superiores a controles saudáveis e, em alguns estudos, foi reportada uma correlação positiva com a atividade da doença, sendo o VEGF apontado como um promissor biomarcador para diagnóstico e prognóstico (ZUBAIR & FRIERI, 2013; ZHOU *et al.*, 2014).

1.1.4.2 Molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1)

A ICAM-1, também conhecida por CD54 (*Cluster of differentiation 54*) é uma glicoproteína de superfície celular induzida por citocinas (como IL-1 e IFN- γ), expressada em vários tipos celulares incluindo células endoteliais e leucócitos. Esta molécula desempenha papel importante na resposta imune inata e adaptativa, como na transmigração endotelial de leucócitos para o foco inflamatório e na interação entre células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos T (LAWSON & WOLF, 2009; LONG, 2011).

Em pacientes com LES, níveis elevados de ICAM-1 correlacionaram-se com a atividade da doença e com a redução da sobrevivência em comparação a indivíduos com níveis normais, possuindo potencial como biomarcador de pior prognóstico da doença (SABRY *et al.*, 2007; AHEARN *et al.*, 2012). Além disso, o aumento dessa molécula de adesão pode estar associado a manifestações cardiovasculares (aterosclerose, calcificações em artérias coronárias e disfunções endoteliais), manifestações renais, principalmente nefrite, e na manutenção do processo inflamatório (TORRES *et al.*, 2009; MOK, 2010; GUAN *et al.*, 2012).

1.2 Citometria de fluxo e CBA - *Cytometric Bead Array*

A citometria de fluxo (CF) é uma importante ferramenta para diagnóstico e pesquisa, aplicada em estudos de avaliação quantitativa e qualitativa tanto de parâmetros celulares (analisando tamanho, granulosidade entre outras características), quanto de estruturas e produtos celulares, como DNA, RNA, marcadores de superfície, citocinas, dentre outros, empregando anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos, sendo uma das estratégias mais eficientes para a identificação destas moléculas (IBRAHIM & VAN DEN ENGH, 2007; PICOT *et al.*, 2012).

A CF consiste em três componentes básicos, a parte fluídica, responsável por conduzir a amostra a ser analisada para o interior do equipamento; o componente óptico e detectores (composto por um feixe luminoso, lasers, com diferentes comprimentos de ondas e detectores capazes de captar a difração da luz em análises de parâmetros celulares, como a intensidade luminosa de fluorocromos após excitação) e por fim o componente eletrônico, composto sobretudo por uma unidade de processamento (computador) responsável por converter os sinais luminosos captados em dados mensuráveis (ADAN *et al.*, 2017).

O *Cytometric Bead Array* é uma das várias aplicações da citometria de fluxo, em que, é possível a análise de várias proteínas solúveis em líquidos biológicos de forma simultânea em uma única reação, utilizando relativamente um pequeno volume de amostra (25 – 50 microlitros) em comparação aos imunoenaios tradicionais, bem como requerendo um menor tempo de execução (CASTILLO & MACCALLUM, 2012).

A técnica de CBA permite avaliar de forma precisa e concisa uma grande variedade de analitos de interesse clínico. Esta técnica é também largamente utilizada na pesquisa, para avaliar, mesmo em baixas concentrações, mediadores inflamatórios, quimiocinas, anticorpos, moléculas de sinalização celular, mediadores apoptóticos, moléculas de adesão, isotipo de imunoglobulinas, dentre outros marcadores, sendo as citocinas, um dos principais alvos avaliados por esta ferramenta. Dentre os tipos de amostras que podem ser submetidas a esta técnica estão soro, plasma, líquido cefalorraquidiano, urina e sobrenadante de cultura celular (MORGAN *et al.*, 2004).

O CBA consiste no uso de *beads* de captura (microesferas) com diferentes intensidades de fluorescência revestidas com anticorpos específicos para cada analito a ser mensurado. As *beads* podem também ser revestidas com antígenos (como exemplo para a detecção de

anticorpos em amostras clínicas), e como indicadores, sendo posteriormente adicionados anticorpos de detecção marcados com composto fluorescente, formando imunocomplexos do tipo “sanduíche” com o analito de interesse. A expressão de diferentes intensidades de fluorescência é detectada pelo equipamento de CF. Dessa forma, é possível a multiplexação de várias *beads* em uma mesma reação (LENG *et al.*, 2008).

A aquisição dos resultados do CBA pode ser feita em quase todos os equipamentos de CF presentes em laboratórios de diagnóstico e pesquisa, sendo esta uma das grandes vantagens desta ferramenta, visto que não demandará na maioria dos casos na aquisição de hardwares específicos, pois a análise é feita em softwares (como o FCAParray™, fornecido pelo fabricante Becton Dickinson® - BD Biosciences) (BERTHOUD *et al.*, 2011; ELSHAL & MCCOY, 2006).

O CBA vem sendo empregado amplamente na pesquisa, como na busca de marcadores auxiliares no diagnóstico de várias patologias, bem como para avaliar a resposta de pacientes ao tratamento e busca por novos marcadores, através da dosagem de diferentes analitos, avaliando a presença e sua concentração em fluidos biológicos (O'Donnell *et al.*, 2013). Dentre as patologias que possibilitam a aplicação da técnica de CBA estão o câncer (detecção e buscas por marcadores), cardiopatias (quantificação de marcadores cardíacos), infecções virais e bacterianas (detecção de anticorpos específicos e de estruturas bacterianas), doenças relacionadas ao metabolismo (dosagem de hormônios), distúrbios autoimunes e demais doenças inflamatórias (quantificação de citocinas de fase aguda e detecção de autoanticorpos) (ANTAL-SZALMÁS *et al.*, 2013).

Diversos estudos de distúrbios autoimunes vêm associando a tecnologia do CBA aos métodos tradicionais para a avaliação dos perfis inflamatórios dos pacientes e resposta a terapêutica (ANTAL-SZALMÁS *et al.*, 2013). Alguns exemplos podem ser observados nos trabalhos conduzidos por Zhao *et al.* (2014) e Miao *et al.* (2014) na avaliação da artrite reumatóide durante a atividade da doença e na resposta ao tratamento, por perfil inflamatório e marcadores de superfície celular.

No LES, o CBA tornou-se uma importante ferramenta para a avaliação, em pesquisa, da atividade e progressão da doença, devido a sua alta sensibilidade e capacidade de dosar diversos analitos de forma simultânea. Dessa forma, é possível a análise de vários parâmetros em amostras de diferentes origens como soro, plasma, líquido cefalorraquidiano e urina, possibilitando, devido ao caráter sistêmico da doença, avaliar o avanço do distúrbio em

diferentes órgãos ou sistemas através da dosagem de marcadores inflamatórios ou de danos teciduais, bem como associá-los a outros marcadores já conhecidos (LIU *et al.*, 2006; FRAGOSO-LOYO *et al.*, 2013; SCHNEIDER *et al.*, 2015).

Devido à falta de biomarcadores específicos e confiáveis para o diagnóstico do LES, o presente estudo tem por objetivo avaliar potenciais biomarcadores inflamatórios utilizando a técnica de CBA que possam auxiliar no diagnóstico e monitoramento da doença.

2. JUSTIFICATIVA

O LES é um distúrbio autoimune crônico que envolve o tecido conjuntivo, de caráter inflamatório e multissistêmico, em decorrência da produção de diversos autoanticorpos e depósitos teciduais de imunocomplexos circulantes em diversos órgãos e tecidos como rins, coração, pulmões e pele, expressando-se clinicamente de forma heterogênea, com elevado risco de morbidade e mortalidade. *Rash* malar, lesões discóides, úlceras orais, fotossensibilidade, serosite, nefrite, alterações neurológicas, hematológicas e imunológicas estão entre as principais manifestações. A busca por novas estratégias que auxiliem no desenvolvimento de novos métodos para o diagnóstico e prognóstico faz-se a cada dia mais necessário, devido ao crescente número de pessoas acometidas por este distúrbio e a gravidade do mesmo. Nesse contexto, o desenvolvimento de testes mais específicos, rápidos e, ao mesmo tempo, menos invasivos e de custo acessível em relação às ferramentas atualmente disponíveis, constitui alvo de interesse de numerosos pesquisadores que militam na área.

A falta de biomarcadores específicos e confiáveis no LES afeta diretamente a tomada de decisões clínicas, mesmo por profissionais experientes. O diagnóstico atual é estabelecido por meio de complexos critérios desenvolvidos pelo *American College of Rheumatology*, que reúne uma série de alterações associadas à doença, mas que não possuem sensibilidade e especificidade altas, sendo em alguns casos associados a outras condições clínicas, elevando dessa forma o risco de um diagnóstico incorreto e conseqüentemente um tratamento também incorreto ou tardio. O LES possui um curso clínico altamente variável, alternando entre períodos de atividade e remissão da doença. Dessa forma, a falta de um preditor deste estado pode dificultar o manejo clínico dos pacientes e impede o desenvolvimento de novas terapias. Uma outra limitação consiste no fato de não haver um teste único que defina se a doença está em atividade ou não.

Neste estudo, tendo em vista a crescente demanda por procedimentos diagnósticos com melhor especificidade e sensibilidade, pretende-se avaliar níveis séricos de marcadores inflamatórios por citometria de fluxo, utilizando a técnica de CBA. Uma vez identificados estes marcadores, vislumbra-se a validação futura dos mesmos para o diagnóstico, definição de atividade da doença e diferenciação do LES de outras condições autoimunes.

Cumprе ressaltar que a versatilidade da técnica de CBA permite a análise simultânea de vários analitos em pequenos volumes de amostras (tipicamente 25-50 µL), enquanto que, os

métodos de ELISA, rotineiramente aplicados, permitem apenas um analito por poço bem como demanda maior volume de amostras em várias reações. Ainda que as novas placas possibilitem a análise de múltiplos analitos, estes são limitados a oito por reação, ao passo que no CBA este número pode chegar a trinta analitos em uma mesma reação (CASTILLO & MACCALLUM; 2012).

Os resultados obtidos, após validados, poderão ajudar no desenvolvimento de novos testes como o ELISA e/ou outros imunoenaios de maior aplicabilidade na rotina laboratorial e que sejam importantes não apenas para o diagnóstico e definição de prognóstico, mas também para o monitoramento da resposta ao tratamento.

Finalmente, pela primeira vez em estudos que objetivam a busca por novos biomarcadores para o LES, está sendo proposta a quantificação simultânea das citocinas INF- α , IL-8, IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 α , RANTES, VEGF e da molécula de adesão ICAM-1, tendo em vista que a literatura, até o momento, revela resultados obtidos somente com a análise isolada destes analitos. Dessa forma poderemos comparar de forma homogênea e integrada a eficiência destes marcadores para a diferenciação entre os grupos definidos neste trabalho.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar potenciais biomarcadores inflamatórios para o LES utilizando o ensaio *Cytometric Bead Array* (CBA), automatizado por citometria de fluxo.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar, pela metodologia de CBA, em soro de pacientes portadores de LES e em grupos controles (portadores de outras doenças autoimunes e indivíduos saudáveis) os biomarcadores inflamatórios: ICAM-1, IL-8, IFN- α , IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 α , RANTES e VEGF.
- Comparar os níveis séricos dos biomarcadores inflamatórios entre os grupos avaliados;
- Correlacionar os níveis séricos dos biomarcadores com os dados demográficos e índice de atividade do LES (SLEDAI 2k modificado).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Normas éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG) sob número de protocolo CAAE - 01928412.8.0000.5149 (ANEXO D) e pela gerência de ensino e pesquisa do Hospital das Clínicas da UFMG (HC-UFMG) sob o número 061/16 (ANEXO E).

Os participantes selecionados para o estudo foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa, e os que estavam de acordo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO VI), autorizando a coleta de sangue e o uso de informações constantes do prontuário médico.

4.2 Seleção de pacientes e de voluntários (controles)

Os pacientes deste estudo foram selecionados no serviço de reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) – Ambulatório Bias Fortes sob supervisão médica e na Faculdade de Farmácia da UFMG (FAFAR-UFMG).

Os grupos de pacientes são compostos por mulheres com diagnóstico de LES conforme critérios do *American College of Rheumatology* (ACR), em acompanhamento clínico sob tratamento ou não e sem outra condição autoimune, tendo o *score* SLEDAI-2k modificado calculado pelo médico no momento da consulta. Pacientes com outras doenças autoimunes sistêmicas (ODA), diagnosticadas conforme critérios de cada doença, com características clínicas e laboratoriais semelhantes ao LES, foram também selecionadas. As pacientes foram recrutadas no serviço de reumatologia do HC-UFMG (Ambulatório Bias Fortes).

O grupo de participantes controles é composto por voluntárias saudáveis de mesma faixa etária recrutadas no HC-UFMG e na FAFAR-UFMG.

A seleção de participantes ocorreu de agosto de 2016 a abril de 2017. Os grupos foram distribuídos da seguinte forma:

- Grupo 1 – LES ($n = 46$):
 - LES baixa atividade (LESBA): pacientes com SLEDAI 2k modificado ≤ 4 , $n = 22$.
 - LES atividade moderada/alta (LESAMA): pacientes com SLEDAI 2k modificado >4 , $n = 24$.
- Grupo 2 – ODA ($n = 42$):
 - Artrite Reumatóide: $n = 11$.
 - Esclerodermia: $n = 10$.
 - Espondilite Anquilosante: $n = 10$.
 - Síndrome de Sjögren primário: $n = 11$.
- Grupo 3 – CONTROLE ($n = 8$).

4.2.1 Critérios de inclusão

4.2.1.1 LES

- Indivíduos do sexo feminino, com idade superior a 18 anos;
- Diagnóstico de LES conforme ACR;
- Assinatura do TCLE pelo paciente ou responsável legal.

4.2.1.2 ODA

- Indivíduos do sexo feminino, com idade superior a 18 anos;
- Diagnóstico de doença autoimune diferente de LES, conforme critérios de cada doença.
- Assinatura do TCLE pelo paciente ou responsável legal.

4.2.1.3 Controle

- Indivíduos do sexo feminino, com idade superior a 18 anos;
- Ausência de doenças infecciosas, inflamatórias ou autoimunes em evidência no momento da coleta ou com sintomas nos 30 dias precedentes (autorrelato);
- Assinatura do TCLE pelo paciente ou responsável legal.

4.2.2 Critérios de exclusão

4.2.2.1 LES e ODA

- Soropositividade para HIV;
- Gestantes;
- Presença de alguma outra condição patológica infecciosa ou inflamatória no momento da coleta ou nos 30 dias precedentes;
- Recusa em assinar o TCLE.

4.2.2.2 CONTROLE

- Soropositividade para HIV;
- Gestantes;
- Presença de algum quadro patológico de caráter infeccioso, infamatório ou autoimune no momento da coleta ou nos 30 dias precedentes (autorrelato);
- Indivíduos portadores de alguma condição autoimune;
- Recusa em assinar o TCLE.

4.2.3 Tamanho da amostra

O cálculo do n amostral foi feito considerando-se o objetivo principal do experimento que foi detectar possíveis diferenças entre os grupos de pacientes e entre estes com o grupo controle, para a avaliação preliminar de potenciais biomarcadores para o LES. Para a determinação, visto que não se detém o conhecimento sobre a frequência populacional da variável em análise, fixou-se o n mínimo de 40 indivíduos por grupos (MIOT, 2011).

O total de indivíduos participantes deste estudo submetidos ao experimento foi de 94 indivíduos.

4.3 Análises laboratoriais

A parte experimental deste estudo foi realizada no Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Farmácia/UFMG e no Centro de Pesquisa René Rachou/CPqRR no

Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM) em colaboração com Dr. Olindo Assis Martins Filho, Dra. Andréa Teixeira de Carvalho e Dra. Fernanda Freire Campos Nunes.

4.3.1 Obtenção dos dados clínicos e laboratoriais

Os dados clínicos e laboratoriais foram extraídos das fichas de acompanhamento clínico de cada paciente, arquivadas no ambulatório Bias Fortes (HC-UFG), contendo informações quanto ao diagnóstico, medicamentos, atual condição clínica do paciente, exames laboratoriais recentes e conduta médica adotada.

4.3.2 Obtenção das amostras

Foram coletadas amostras de 10 mL de sangue por punção venosa em fossa antecubital em tubos estéreis sem anticoagulante e 5 mL em tubo com citrato de sódio utilizando o sistema Vacutainer® (Becton-Dickinson Bioscience). As amostras foram rapidamente centrifugadas a 3000 g, por 10 minutos, em centrífuga não refrigerada, para a separação de soro ou plasma, sendo logo após, transferidos para microtubos estéreis e devidamente identificados em alíquotas (500 µL), as quais foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

4.3.3 Dosagem dos biomarcadores inflamatórios por Citometria de Fluxo - CBA

Os biomarcadores foram quantificados nos soros de pacientes e controles, utilizando kit CBA-Flex de proteínas solúveis (*Human soluble protein Master Buffer kit*: ICAM-1 – catálogo n.º.: 560269, INF- α – catálogo n.º.: 560379, IL-8 – catálogo n.º.: 558277, IP-10 – catálogo n.º.: 558280, MCP-1 – catálogo n.º.: 558287, MIG – catálogo n.º.: 558286, MIP-1 α – catálogo n.º.: 558325, RANTES – catálogo n.º.: 558324, VEGF – catálogo n.º.: 558336, Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, BD, San Diego, CA, EUA). A metodologia utilizada foi adaptada do protocolo original proposto pelo fabricante.

4.3.3.1 Preparo das amostras

As amostras de soro aliquotadas foram descongeladas em banho-maria à 37° C, sendo posteriormente centrifugadas, em microcentrífuga, à 21.000 g durante 10 minutos e recolhido o sobrenadante.

4.3.3.2 Preparo da curva padrão

Para a curva padrão, adicionou-se os padrões liofilizados de cada analito em um tubo Falcon de 15 mL reconstituindo-os com 4mL de diluente de ensaio (*Top Standard – TS*). Após 15 minutos em temperatura ambiente, foram feitas diluições seriadas até 1:512 em tubos de polipropileno de 5 mL, contendo 500 µL de diluente de ensaio, com a finalidade de aumentar o limiar de detecção para pequenas concentrações dos biomarcadores na amostra.

4.3.3.3 Preparo dos reagentes

Para o preparo dos reagentes utilizados na técnica de citometria de fluxo / CBA, seguiu-se rigorosamente as orientações do fabricante, resumidas na **tabela 1**.

Tabela 1. Reagentes utilizados na técnica de CBA.

Reagentes	Definição	Volume total	Volume utilizado no experimento
<i>Beads</i>	São microesferas de poliestireno marcadas com diferentes fluorocromos, recobertas com anticorpos específicos de cada analito a ser testado.	0,25 mL*	0,0584 mL*
Diluente de captura de <i>beads</i>	Solução fornecida pelo fabricante com a finalidade de diluir as <i>beads</i> de cada analito.	5 mL	2,8616 mL
PE (ficoeritrina)	Anticorpos detectores específico para o analito de interesse, conjugados com ficoeritrina (fluorocromo).	0,25 mL*	0,0584 mL*

Diluyente de PE	Solução fornecida pelo fabricante com a finalidade de diluir o anticorpo detector para cada analito.	5 mL	2,5696 mL
<i>Wash buffer</i>	Solução de lavagem fornecida pelo fabricante. Com a finalidade de lavar componentes não reativos.	130 mL	100 mL
Mistura de <i>beads</i>	Solução produzida durante o experimento contendo <i>beads</i> de cada analito e diluyente de captura de <i>beads</i> .	-	2.920 μ L
Reagente PE diluído.	Solução produzida durante o experimento contendo PE de cada analito e diluyente de PE.	-	2.628 μ L

* Volume correspondente a um marcador.

4.3.3.4 Preparo das placas

Foram utilizadas duas placas de poliestireno com fundo em “U” de 96 poços (BD Falcon U-Bottom Tissue Culture Plates, Sterile, BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

- 1- Foram pipetados 20 μ L dos padrões diluídos e dois controles negativos (solução de lavagem), nas colunas A1 à A12 da placa e posteriormente o mesmo volume do sobrenadante das amostras a serem testadas nos poços restantes;
- 2- Após homogeneizar em vortex por 5 minutos, foram adicionados 20 μ L de mistura de *beads* em todos os poços;
- 3- Incubou-se as placas, abrigadas da luz, por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente;
- 4- Após incubação, foram adicionados 18 μ L de reagente PE diluído;
- 5- Incubou-se as placas, por 2 horas, em agitador orbital – temperatura ambiente;
- 6- Após incubação, adicionou-se 500 μ L de solução de lavagem (*Wash Buffer*) em cada poço de reação.
- 7- As placas foram centrifugadas à 1400 rpm por 7 minutos.
- 8- O sobrenadante foi desprezado, e posteriormente, adicionou-se 200 μ L de solução de lavagem para ressuspensão das *beads*, e então procedeu-se à aquisição e análises dos dados.

4.3.3.5 Aquisição e análise dos dados

A leitura das placas foi realizada utilizando o equipamento de citometria de fluxo BD FACSVerser™ (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) adquirindo 300 eventos por poço.

Para a análise dos resultados obtidos na aquisição, por intensidade média de fluorescência (IMF), foi utilizado o software FCAParray™ (versão 3.0) fornecido pela BD Biosciences. Os resultados foram expressos em pg/mL (picograma por mililitro).

4.4 Análise estatística

As análises estatísticas e elaboração dos gráficos (Box Plot) foram realizados utilizando-se os softwares R (versão 3.4.3) e MiniTab (versão 17) sob orientação da professora Dra. Edna Afonso Reis do departamento de estatística do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICEX-UFMG). A comparação das médias de idade dos indivíduos de cada grupo foi realizada pelo Teste de Tukey. As variáveis não-paramétricas foram analisadas por meio do teste de Mann-Whitney, para identificação da diferença de medianas entre grupos. Além disso, foi realizado o teste de correlação de Rô de Spearman entre os parâmetros avaliados e dados demográficos e laboratoriais dos pacientes. Os dados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi menor do que 0,05 ($p < 0,05$).

4.5 Delineamento experimental

Com a finalidade de facilitar o entendimento das etapas do estudo, a **figura 1** apresenta o fluxograma com o delineamento experimental.

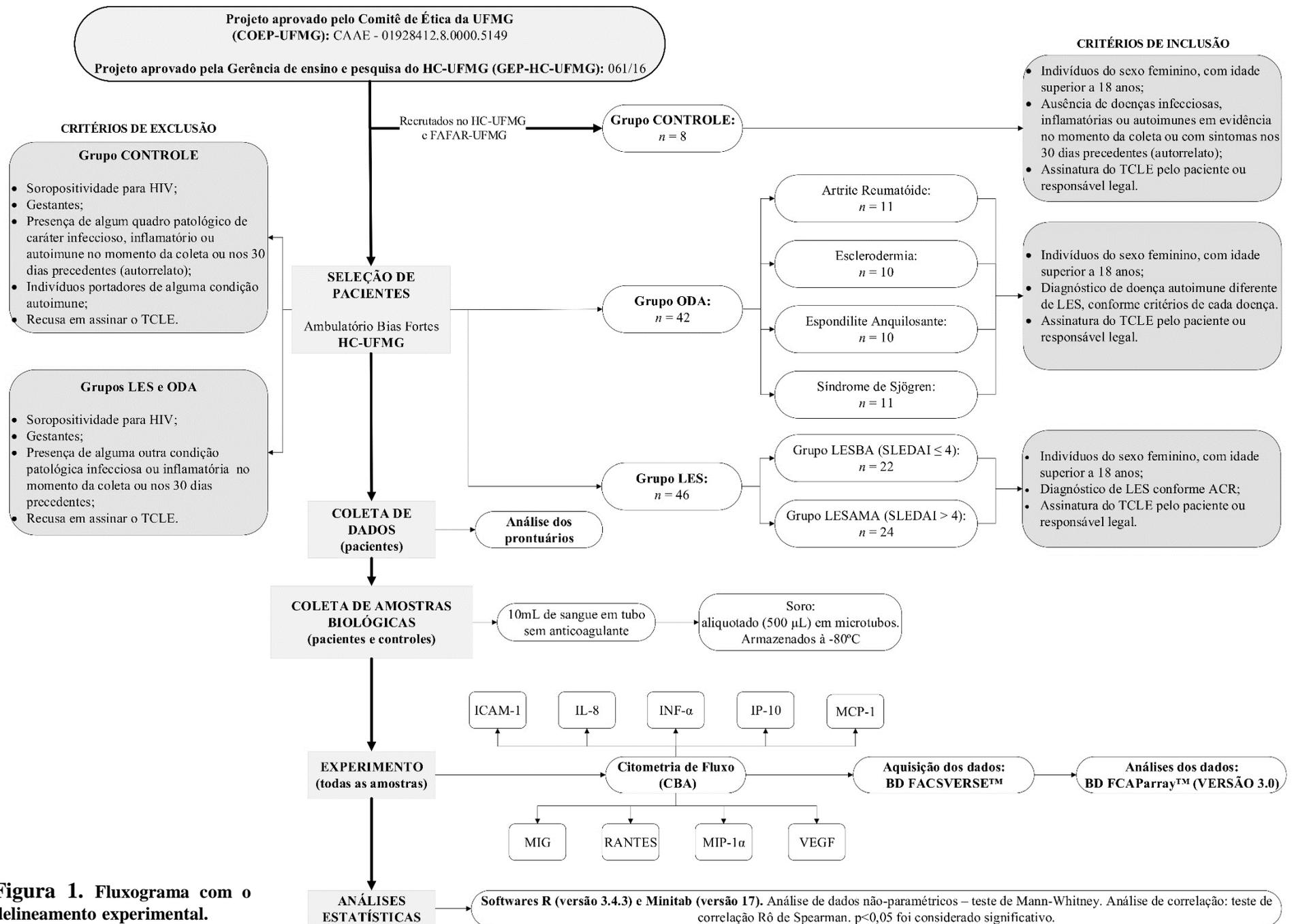


Figura 1. Fluxograma com o delineamento experimental.

5. RESULTADOS

5.1 População do estudo

O presente estudo incluiu 94 participantes que atenderam aos critérios descritos nos itens 4.2.1 e 4.2.2. Os pacientes com LES (Lúpus Eritematoso Sistêmico) e ODA (Outras Doenças Autoimunes) foram recrutados no serviço de reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG) – Ambulatório Bias Fortes.

O grupo LES, foi formado por 46 pacientes com idade média de $39,64 \pm 9,61$ anos. Quanto ao tempo de doença, os pacientes com LES apresentaram média de $10,81 \pm 7,34$ anos, sendo que pacientes com baixa atividade apresentaram média de $8,64 \pm 7,04$ anos e pacientes com atividade moderada/alta $12,80 \pm 7,18$ anos, situação essa que pode estar associada à resistência ao tratamento por pacientes com maior grau de atividade da doença. O grupo LES foi subdividido em LESBA (Lúpus Eritematoso Sistêmico Baixa Atividade), pacientes com atividade da doença menor ou igual a 4 (SLEDAI 2k modificado), composto por 22 pacientes com idade média de $36,55 \pm 9,51$ anos, e LESAMA (Lúpus Eritematoso Sistêmico Atividade Moderada/Alta), pacientes com atividade da doença maior que 4 (segundo SLEDAI 2k modificado), composto por 24 pacientes com idade média de $42,29 \pm 11,09$ anos. O grupo ODA é composto por 42 pacientes, com idade média de $51,93 \pm 13,48$ anos, diagnosticados com doenças autoimunes sistêmicas diferentes de LES (artrite reumatóide, esclerodermia, espondilite anquilosante e síndrome de Sjögren), com tempo médio de doença entre os pacientes de $11,93 \pm 9,15$ anos.

O grupo controle incluiu 8 participantes saudáveis com idade média de $42,50 \pm 11,50$ anos, recrutados no HC-UFMG e na Faculdade de Farmácia – UFMG.

O valor p das idades (teste de Tukey) foi maior que 0,05 entre os controles saudáveis e pacientes LES, mesmo em diferentes graus de atividade, e pacientes com outras doenças autoimunes. Porém este foi menor que 0,05 quando comparados os grupos de pacientes com LES e ODA, devido ao fato do grupo de pacientes com lúpus ser composto principalmente por mulheres jovens, enquanto que o grupo ODA possui maior

média etária em razão da presença de pacientes com artrite reumatóide que são geralmente idosos.

Os dados demográficos dos grupos estão apresentados na **tabela 2**. Na **tabela 3**, foram resumidos os critérios ACR apresentados pelas pacientes do estudo no momento do diagnóstico.

Tabela 2. Dados demográficos dos participantes do estudo.

	Grupos					Associação comparativa	Valor <i>p</i> (idades)
	LES <i>n</i> = 46	LESBA <i>n</i> = 22	LESAMA <i>n</i> = 24	ODA <i>n</i> = 42	CONTROLE <i>n</i> = 8		
Características demográficas	Média ± DP						
Idade (anos)	39,64 ± 9,61	36,55 ± 9,51	42,29 ± 11,09	51,93 ± 13,48	42,50 ± 11,50	CONTROLE x LES CONTROLE x ODA	0,786 0,152
Tempo de doença (anos)	10,81 ± 7,34	8,64 ± 7,04	12,80 ± 7,18	11,93 ± 9,15		CONTROLE x LESBA CONTROLE x LESAMA	0,597 1,000
SLEDAI (score)	0 - 20 5,02 ± 4,63	≤ 4 1,32 ± 1,52	> 4 8,42 ± 3,82			ODA x LES ODA x LESBA ODA x LESAMA	0,000 0,000 0,008
						LESBA x LESAMA	0,336

“DP” – Desvio padrão; “LES” – Lúpus Eritematoso Sistêmico; “LESBA” - Lúpus Eritematoso Sistêmico de baixa atividade; “LESAMA” – Lúpus Eritematoso Sistêmico de atividade moderada/alta; “ODA” – Outras doenças autoimunes.

Tabela 3. Critérios ACR apresentados pelos pacientes com LES no momento do diagnóstico. Dados obtidos dos prontuários médicos.

Manifestações	Total de pacientes (%)	LESBA (%)	LESAMA (%)
Eritema malar	23 (50%)	11 (50%)	12 (50%)
Lesões discóide	12 (22%)	5 (23%)	7 (29%)
Fotossensibilidade	21 (46%)	9 (41%)	12 (50%)
Úlceras orais	15 (33%)	7 (32%)	8 (33%)
Artrite (não erosiva)	28 (61%)	13 (59%)	15 (63%)
Serosite (pleural, pericárdica ou peritoneal)	15 (33%)	8 (36%)	7 (29%)
Glomerulonefrite	32 (70%)	14 (64%)	18 (75%)
Distúrbio neurológico	7 (15%)	4 (18%)	3 (13%)
Achados hematológicos	35 (76%)	17 (77%)	18 (75%)
Linfopenia	24 (52%)	10 (45%)	14 (58%)

Anemia	18 (39%)	8 (36%)	10 (42%)
Plaquetopenia	9 (20%)	7 (32%)	2 (8%)
Leucopenia	14 (30%)	4 (18%)	10 (42%)
Achados Imunológicos	32 (70%)	16 (73%)	16 (67%)
Anti-Sm	13 (28%)	7 (32%)	6 (25%)
Anti-DNA	20 (43%)	10 (45%)	10 (42%)
VDLR	2 (4%)	1 (5%)	1 (4%)
Anti-cardiolipina	11 (24%)	7 (32%)	4 (17%)
Anticoagulante Lúpico	6 (13%)	3 (14%)	3 (13%)
Anticorpos antinuclear (FAN-Hep2)	42 (91%)	20 (91%)	22 (92%)

“Sm” – *Smith*. “VDRL” – *Venereal Disease Research Laboratory*. “FAN” – Fator antinuclear.

As manifestações com maior frequência entre os pacientes com LES, no momento do diagnóstico, foram a presença de anticorpos antinucleares (FAN-Hep2), apresentado por 91% das participantes, seguido por distúrbios hematológicos (76%), sendo a linfopenia a principal alteração (52% dos pacientes), quadro de nefrite (70%) e 70% com alterações imunológicas, sendo que em 43% destas a presença de anticorpos anti-DNA foi observada.

Entre as manifestações com menor frequência entre os pacientes, estão algumas alterações imunológicas como VDLR (2%), anticoagulante lúpico (13%) e anticorpos anti-cardiolipina (24%), plaquetopenia (20%), lesões discóides (22%) e distúrbios neurológicos (15%).

5.2 Dados laboratoriais

Os dados contidos nas **tabelas 4 e 5** foram obtidos mediante análise dos prontuários médicos dos pacientes no momento da coleta de amostras biológicas, conforme sua disponibilidade.

Tabela 4. Exames laboratoriais dos pacientes com LES e ODA. Dados obtidos dos prontuários médicos no momento da coleta.

	Média ± DP			Valor P			
	LESBA	LESAMA	ODA	LESBA x LESAMA	LESBA x ODA	LESAMA x ODA	LES x ODA
Eritrograma							
Hemoglobina [g/dL]	13,3 ± 1,07	12,47 ± 1,75	12,81 ± 1,13	0,084	0,102	0,420	0,631
Hematócrito [%]	39,95 ± 3,00	38,42 ± 5,66	40,10 ± 7,61	0,095	0,589	0,132	0,548
HCM [pg]	29,52 ± 5,81	30,41 ± 3,26	28,91 ± 2,73	0,674	0,655	0,366	0,424
VCM [fL]	88,81 ± 5,81	85,75 ± 14,19	88,52 ± 5,93	0,833	0,774	0,607	0,622
RDW [%]	14,35 ± 1,57	19,68 ± 22,69	15,08 ± 2,25	***	***	***	***
Plaquetas [Nº/mm3 x10³]	234,91 ± 70,40	219,36 ± 81,00	242,55 ± 73,72	0,489	0,663	0,210	0,294
Leucograma (x10³)							
Gl. Leucócitos [Nº/mm3]	5,81 ± 3,79	5,00 ± 2,41	6,21 ± 2,09	0,691	0,111	0,025*	0,019*
Neutrófilos [Nº/mm3]	3,74 ± 2,77	3,21 ± 1,77	3,53 ± 1,49	0,857	0,475	0,370	0,325
Linfócitos [Nº/mm3]	1,60 ± 0,73	1,30 ± 0,73	1,96 ± 0,75	0,152	0,053	0,004*	0,004*
Eosinófilos [Nº/mm3]	0,10 ± 0,10	0,06 ± 0,07	0,14 ± 0,10	0,581	0,766	0,934	0,890
Monócitos [Nº/mm3]	0,54 ± 0,32	0,47 ± 0,30	0,46 ± 0,20	0,152	0,279	0,040*	0,087
Relação Neutr./linf.	2,38 ± 1,15	4,63 ± 2,28	2,2 ± 1,67	0,157	0,173	0,017*	0,023*

*p<0,05 = significativo (teste de Mann-Whitney). *** Não foram realizadas análises estatísticas. “DP” – Desvio padrão. “HCM” – Hemoglobina corpuscular média. “VCM” – Volume corpuscular médio. “RDW” - *Red Cell Distribution Width*. “Gl” – Global.

Foram observadas algumas diferenças significativas no leucograma dos pacientes. Na avaliação das medianas da contagem global de leucócitos entre os grupos LESAMA e ODA encontrou-se um valor p de 0,025, já quando comparado o grupo com todos os indivíduos com LES com o grupo ODA, o valor p encontrado foi de 0,019.

Diferenças estatisticamente significativas também foram observadas entre os grupos LESAMA e ODA ao avaliar as medianas nas contagens de linfócitos (p= 0,004) e monócitos (p= 0,040), sendo menores em pacientes com lúpus com atividade moderada/alta. A relação neutrófilo/linfócito (p= 0,017) foi maior no grupo LESAMA em relação ao grupo ODA. A contagem de linfócitos apresentou diferença entre os grupos LES e ODA (p= 0,004). A relação neutrófilo/linfócito entre os grupos LES e ODA mostrou-se também significativa (p= 0,023).

Não foram observadas diferenças significativas no eritrograma e contagem de plaquetas dos pacientes, entretanto constatou-se que no subgrupo LESAMA foram

observadas as menores médias na maioria dos elementos mensurados, indicando uma possível correlação negativa (inversa) com a atividade do lúpus.

Tabela 5. Exames laboratoriais complementares dos pacientes com LES e ODA. Dados obtidos dos prontuários médicos no momento da coleta.

	Média ± DP			Valor P			
	LESBA	LESAMA	ODA	LESBA x LESAMA	LESBA x ODA	LESAMA x ODA	LES x ODA
Exames complementares							
C3 [mg/dL]	105,23 ± 40,69	85,50 ± 29,26	100,11 ± 28,25	0,043*	0,500	0,187	0,678
C4 [mg/dL]	20,82 ± 10,44	16,77 ± 9,68	19,60 ± 11,17	0,168	0,597	0,747	0,946
AST [U/L]	25,20 ± 8,97	28,10 ± 10,32	24,32 ± 6,68	0,393	0,791	0,300	0,643
ALT [U/L]	26,30 ± 11,85	32,95 ± 18,19	27,98 ± 12,58	0,367	0,669	0,348	0,770
Gama GT [U/L]	34,00 ± 9,90	64,65 ± 51,41	35,53 ± 29,64	***	0,387	***	0,190
Fosfatase Alcalina [U/L]	82,00 ± 46,67	112,70 ± 23,05	150,28 ± 132,51	***	1,000	***	0,663
LDL [mg/dL]	91,07 ± 38,25	101,63 ± 47,20	124,82 ± 32,09	0,698	0,175	0,168	0,095
HDL [mg/dL]	50,13 ± 7,68	43,29 ± 9,50	51,86 ± 11,94	0,183	1,000	0,191	0,432
VHS [mm/h]	13,25 ± 11,70	39,15 ± 42,82	38,17 ± 12,79	0,299	0,043*	0,567	0,159
Proteína C reativa [mg/dL]	7,73 ± 7,14	7,45 ± 5,89	13,11 ± 14,35	0,507	0,666	0,791	0,900
Albumina sérica [g/dL]	4,19 ± 0,36	3,30 ± 1,24	4,04 ± 0,80	0,052	0,779	0,047*	0,292
Creatinina sérica [mg/dL]	0,74 ± 0,16	0,78 ± 0,21	1,45 ± 4,36	0,259	0,159	0,992	0,423
Ureia sérica [mg/dL]	26,40 ± 7,45	34,11 ± 17,55	32,89 ± 12,93	0,193	0,173	0,801	0,544

*p<0,05 = significativo (teste de Mann-Whitney). *** Não foram realizadas análises estatísticas. “DP” – Desvio padrão. “AST” – aspartato aminotransferase. “ALT” – Alanina aminotransferase. “LDL” – Lipoproteína de baixa densidade. “HDL” – Lipoproteína de alta densidade. “VHS” – Velocidade de hemossedimentação.

A **tabela 5** mostra os resultados dos exames complementares dos pacientes, extraídos dos prontuários médicos. O grupo LESAMA revelou valores menores em alguns exames, como o sistema complemento e albumina sérica, que são condizentes com a atividade da doença. Similarmente ao encontrado em pacientes com LES em atividade, observamos maiores valores de enzimas hepáticas (AST, ALT, Gama GT e fosfatase alcalina), velocidade de hemossedimentação (VHS) e ureia sérica no grupo LESAMA. Foram encontradas diferenças significativas nos exames de dosagem do componente 3 (C3) do sistema complemento entre os grupos LESBA (105,23 ± 40,69 mg/dL) e LESAMA (85,50 ± 29,26 mg/dL) (p= 0,043), em que os pacientes com atividade moderada/alta apresentaram níveis mais baixos de C3 em relação aos pacientes com baixa atividade, e um valor p relativamente baixo (p= 0,052) nos níveis séricos de albumina entre estes grupos, que mesmo não atingindo um valor significativo, pode, em estudos

com uma casuística maior, apresentar-se como estatisticamente relevante. Observou-se também diferença significativa nos resultados de albumina sérica entre os grupos LESAMA e ODA ($p= 0,047$), sendo mais baixo nos pacientes com LES ($3,30 \pm 1,24$ g/dL), e nos resultados de velocidade de hemossedimentação (VHS) entre os grupos LESBA ($13,25 \pm 11,70$ mm/h) e ODA ($38,17 \pm 12,79$ mm/h) ($p= 0,043$).

Como forma de investigar o “*status* saudável” dos participantes do grupo controle, foram realizados o eritrograma e plaquetograma dos mesmos, cujos resultados podem ser observados na **tabela 6**. Não foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos de pacientes em relação ao grupo de indivíduos saudáveis.

Tabela 6. Eritrograma e plaquetograma dos controles saudáveis e respectivas análises comparativas com os grupos de pacientes.

	Média ± DP		Valor P		
	CONTROLE <i>n</i> = 8	CONTROLE x ODA	CONTROLE x LESBA	CONTROLE X LESAMA	CONTROLE x LES
Eritrograma					
Hemoglobina [g/dL]	13,48 ± 0,67	0,094	0,707	0,130	0,296
Hematócrito [%]	40,55 ± 1,92	0,280	0,511	0,086	0,192
HCM [pg]	29,34 ± 1,65	1,000	0,807	0,632	0,688
VCM [fL]	87,51 ± 3,75	0,590	0,690	1,000	0,839
Plaquetas [N^o/mm³ x10³]					
	248,63 ± 44,66	0,717	0,421	0,223	0,265

* $p < 0,05$ = significativo (teste de Mann-Whitney). “DP” – Desvio padrão. “HCM” – Hemoglobina corpuscular média. “VCM” – Volume corpuscular médio.

5.3 Medicamentos utilizados pelos pacientes sob tratamento

Dentre os medicamentos de maior uso entre os pacientes com LES, estão os corticóides (sendo o principal a prednisona) correspondendo a 78,26% dos pacientes, sucedido por farmacos antimaláricos (hidroxicloroquina e difosfato de cloroquina) correspondendo a 76,08% e azatioprina (28,26% dos pacientes). Em menor escala de uso por pacientes com LES, constam os medicamentos metotrexato (10,87%) e ciclofosfamida (2,17%).

Em relação aos pacientes pertencentes ao grupo ODA, os medicamentos em maior uso são o metotrexato, correspondendo a 27,27% , e prednisona (25%), enquanto os de menor uso foram azatioprina (2,27%) e medicamentos baseados em anticorpos monoclonais, como rituximabe (4,55%) e infliximabe (2,27%). Os dados tabulados das medicações dos pacientes estão apresentados na **tabela 7**. Cumpre ressaltar que os pacientes estavam em uso de um ou mais medicamentos.

Tabela 7. Medicamentos em uso pelos pacientes no momento da coleta. Dados obtidos dos prontuários. Dados obtidos dos prontuários médicos.

LES		ODA	
Medicamentos	Total (%)	Medicamentos	Total (%)
Prednisona	36 (78,26%)	Metotrexato	12 (27,27%)
Antimaláricos (HC e DC)	35 (76,08%)	Prednisona	11 (25,00%)
Azatioprina	13 (28,26%)	Hidroxicloroquina	5 (11,36%)
Micofenolato de Mofetil	8 (17,39%)	Golimumabe	3 (6,82%)
Metotrexato	5 (10,87%)	Rituximabe	2 (4,55%)
Ciclofosfamida	1 (2,17%)	Azatioprina	1 (2,27%)
		Infliximabe	1 (2,27%)
		Tocilizumabe	1 (2,27%)
		Adalimumabe	1 (2,27%)
		Tofacitinibe	1 (2,27%)

HC – Hidroxicloroquina; DC – Difosfato de Cloroquina

5.4 Dosagem dos biomarcadores por CBA

Os biomarcadores inflamatórios (ICAM-1, IL-8, INF- α , IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 α , RANTES e VEGF) foram dosados a partir do soro dos 86 pacientes (LES e ODA) e dos 8 indivíduos saudáveis (controles), utilizando citometria de fluxo associado a técnica de CBA.

O experimento foi realizado no Laboratório de Biomarcadores da Fundação Oswaldo Cruz de Minas Gerais (Centro de Pesquisa René Rachou) sob orientação dos pesquisadores Dr. Olindo Assis Martins Filho, Dra. Andréa Teixeira de Carvalho e da Dra. Fernanda Freire Campos Nunes, e apoio técnico da bióloga Lorena Júnia de Souza Santos.

Para as dosagens, conforme pode ser observado na **figura 2**, foram feitas curvas-padrão de todos os biomarcadores com a finalidade de calibrar o equipamento para determinar as concentrações dos analitos nas amostras testadas. Os padrões foram avaliados medindo a intensidade de fluorescência média (IFM) por concentração, partindo de dois controles negativos, e seguindo das maiores diluições (1:512) até o mais concentrado, contendo aproximadamente 2.500 pg/mL.

Em todas as curvas observou-se linearidade semelhante, permitindo-nos uma interpolação satisfatória das diferentes concentrações para cada analito avaliado em cada grupo. Além disso, através do perfil obtido das curvas, foi possível avaliar a viabilidade dos reativos utilizados.

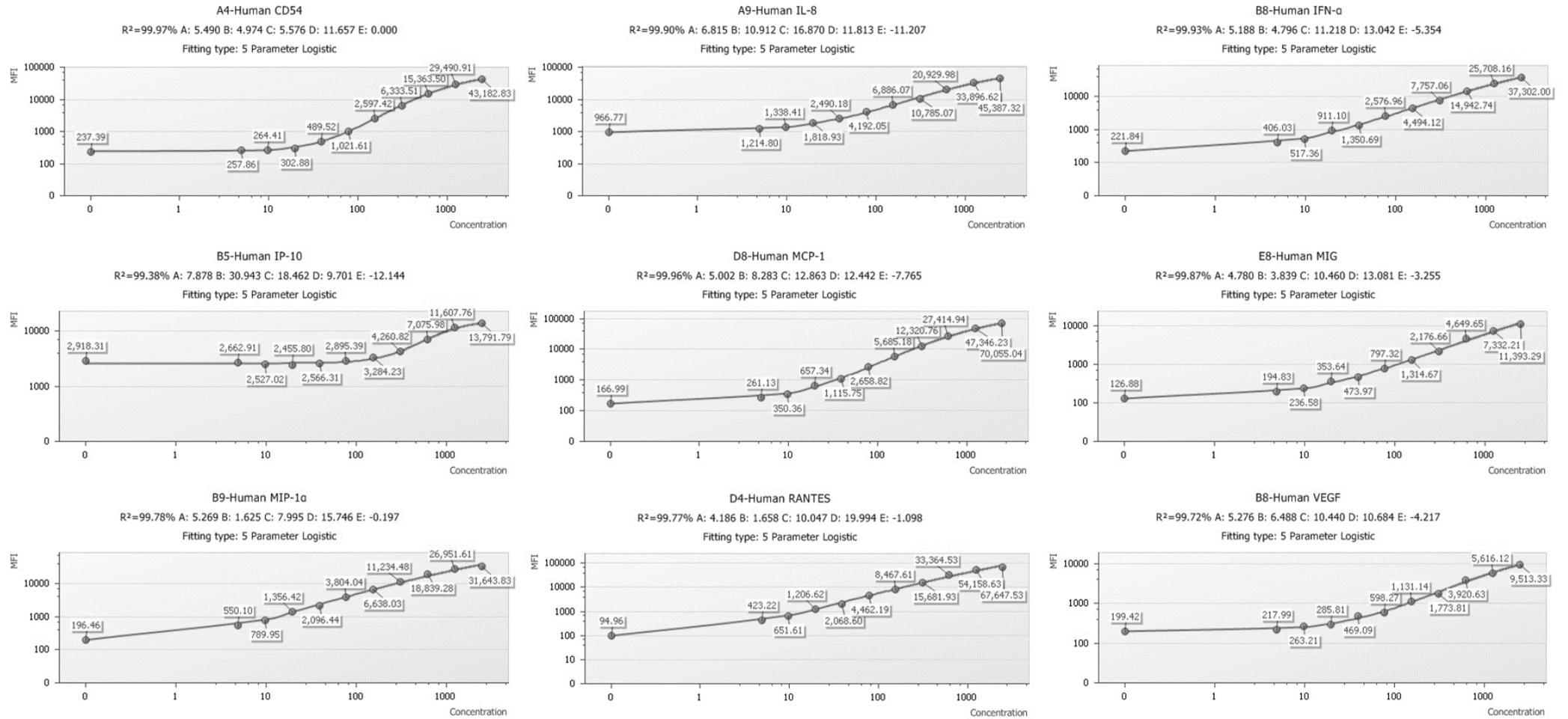


Figura 2. Curvas-padrão para o painel BD™ Human soluble protein Master Buffer kit (ICAM-1 [CD54], INF- α , IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIG, RANTES e VEGF) analisado utilizando o software FCAParray™.

5.4.1 ICAM-1

As dosagens da molécula de adesão ICAM-1 foram mais elevadas em pacientes com LES em que o valor de mediana (intervalo interquartil) foi de 35.631,00 pg/mL (0,00 – 189.155,00), sendo maior em pacientes com baixa atividade da doença 40.206,00 pg/mL (0,00 – 373.692,00). As dosagens foram mais baixas nos controles saudáveis, com valor de mediana (intervalo interquartil) igual à 17.532,00 pg/mL (5.964,00 – 25.153,00). Entretanto, não foram encontradas diferenças significativamente relevantes. As concentrações de ICAM-1 em cada grupo estão apresentada na **figura 3**.

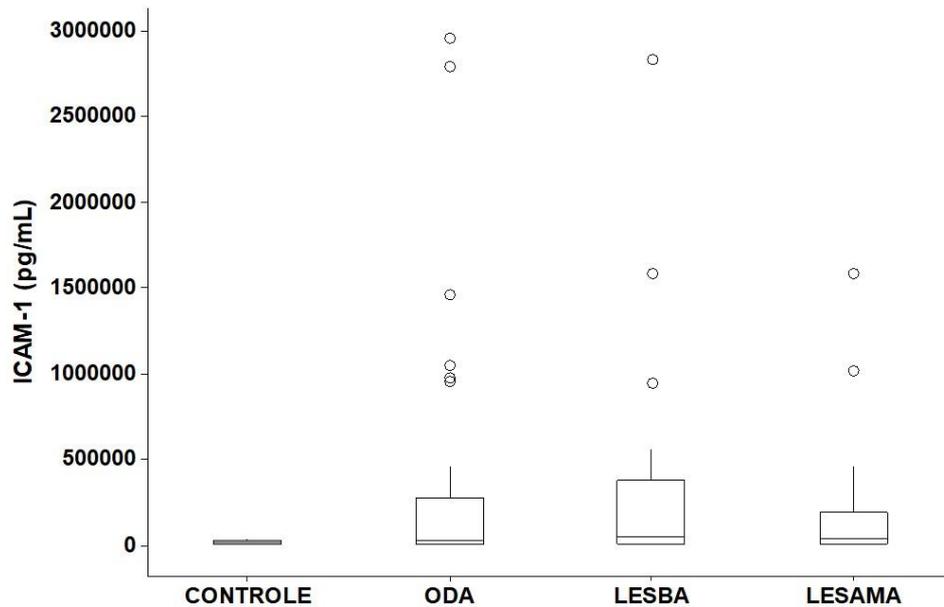


Figura 3. Boxplot representativo da concentração sérica da molécula de adesão ICAM-1 em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$).

5.4.2 IFN- α

As análises dos níveis séricos da citocina IFN- α não indicaram diferenças significativas entre os grupos, em decorrência do fato de muitos pacientes (54% LESBA, 55% LESAMA e 59% ODA) e indivíduos controles (75%) apresentarem resultados de dosagem igual à 0,0 pg/mL, resultando em uma mediana de mesmo valor. Os dados com as concentrações de IFN- α em cada grupo estão apresentada na **figura 4**.

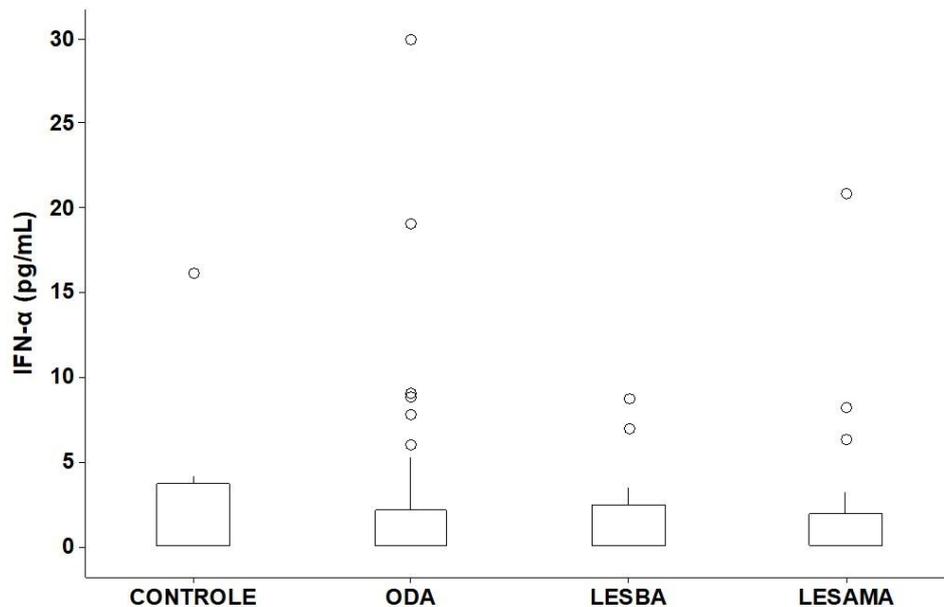


Figura 4. Boxplot representativo da concentração sérica da citocina IFN- α em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$).

As concentrações foram mais elevadas no grupo CONTROLE com valor de mediana (intervalo interquartil) igual à 0,00 pg/mL (0,00 – 3,65) e mais baixas nos pacientes com LES, 0,00 pg/mL (0,00 – 2,11), sobretudo nos pacientes com atividade moderada/alta da doença, 0,00 pg/mL (0,00 – 1,94).

5.4.2 IL-8

As análises dos níveis séricos da citocina IL-8, não mostraram diferenças entre o grupo de indivíduos saudáveis em relação aos grupos de pacientes com doenças autoimunes, entretanto, diferenças significativas foram evidenciadas entre as concentrações dos grupos ODA e LESBA (valor $p = 0,000$), ODA e LESAMA ($p = 0,024$) e entre os grupos de pacientes com lúpus de baixa atividade e de moderada/alta (LESBA e LESAMA, $p = 0,026$), os dados estão apresentados na **figura 5**. Na **figura 6**, ao se reunir num só grupo todos os pacientes com lúpus (grupo LES) e comparar com o grupo ODA, foi observada diferença significativa entre estes ($p = 0,000$).

As concentrações foram mais elevadas no grupo ODA com valor de mediana (intervalo interquartil) igual à 35,80 pg/mL (5,50 – 137,40) e mais baixas nos pacientes com LES, 1,17

pg/mL (0,00 – 20,50), sobretudo nos pacientes com baixa atividade da doença, 0,00 pg/mL (0,00 – 8,09).

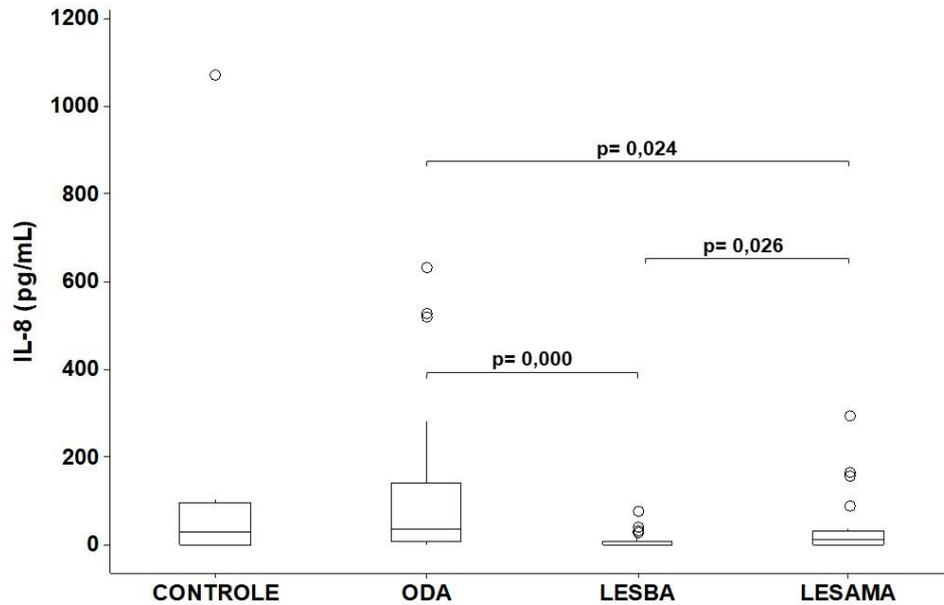


Figura 5. Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina IL-8 (CXCL8) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$).

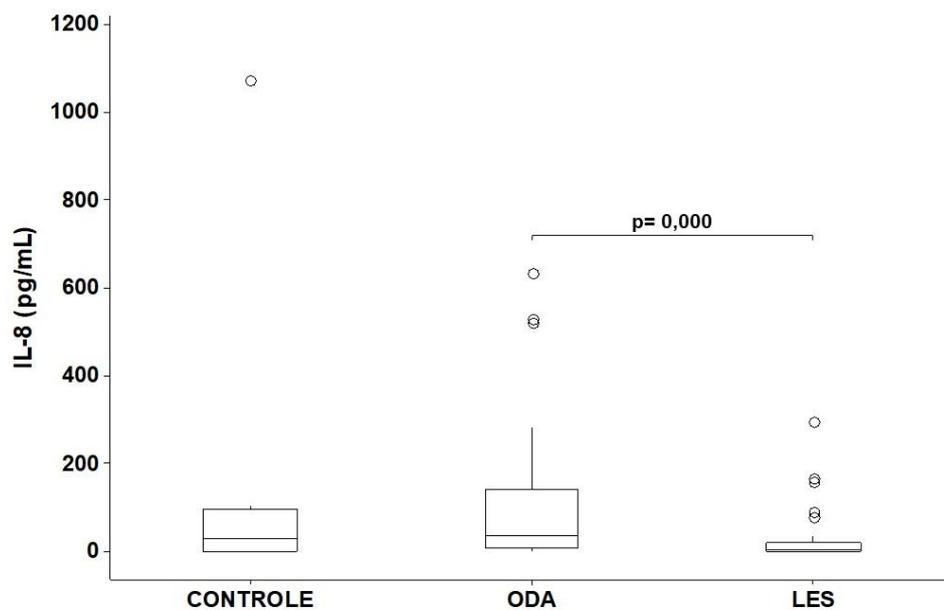


Figura 6. Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina IL-8 (CXCL8) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); e LES ($n = 46$).

5.4.4 IP-10

Conforme pode ser observado na **figura 7**, as análises dos níveis séricos de IP-10 evidenciaram diferenças significativas entre indivíduos saudáveis e pacientes com lúpus em diferentes níveis de atividade da doença, podendo ser observadas diferenças entre o grupo CONTROLE e LESAMA ($p= 0,023$) e CONTROLE e LESBA ($p= 0,009$).

Observou-se também diferença entre os grupos de pacientes com LES de baixa atividade com pacientes com atividade moderada/alta ($p= 0,002$), bem como entre o primeiro e o grupo de pacientes com outras autoimunidades (ODA) ($p= 0,008$), porém não ocorrendo o mesmo quando comparado aos pacientes com atividade maior que 4.

Não foram encontrados resultados semelhantes, quando se agrupou todos os pacientes com lúpus (LES) comparando-o aos demais grupos.

As dosagens de IP-10 foram mais elevadas em pacientes com LES em que o valor de mediana (intervalo interquartil) foi de 578,00 pg/mL (0,00 – 1.236,00), sendo maior em pacientes com baixa atividade da doença 988,00 pg/mL (602,00 – 1.470,00). As dosagens foram menores no grupo de pacientes com LES de atividade moderada/alta, com valor de mediana (intervalo interquartil) igual à 0,00 pg/mL (0,00 – 431,00).

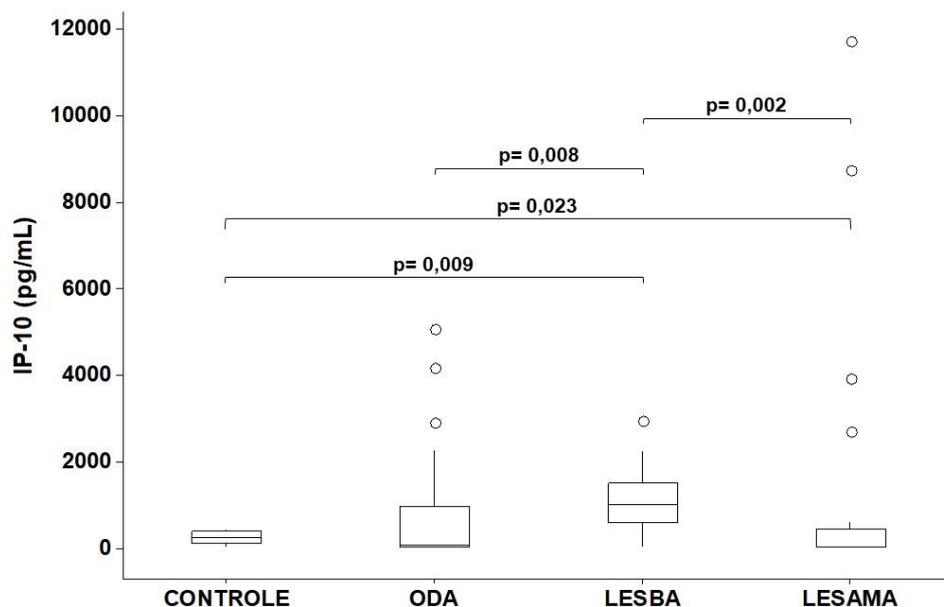


Figura 7. Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina IP-10 (CXCL10) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$).

5.4.5 MCP-1

As concentrações da quimiocina MCP-1 foram mais elevadas no grupo CONTROLE com valor de mediana (intervalo interquartil) igual à 85,20 pg/mL (55,60 – 117,70) e mais baixas nos pacientes com outras doenças autoimunes (ODA), 54,96 pg/mL (30,87 – 83,80). Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. As concentrações de MCP-1 em cada grupo estão apresentadas na **figura 8**.

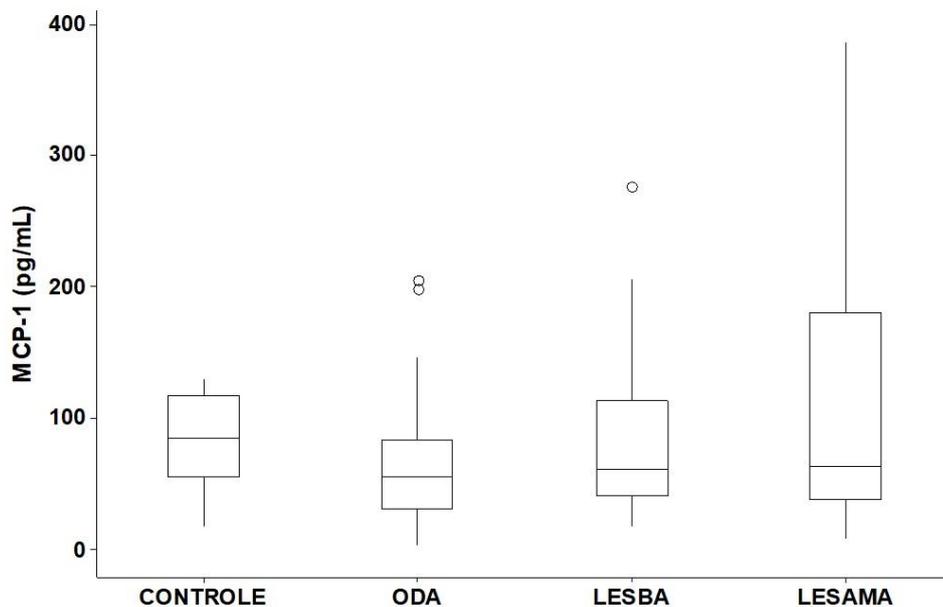


Figura 8. Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina MCP-1 (CCL2) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$).

5.4.6 MIG

As análises das concentrações da citocina MIG estão entre as mais promissoras, pois apresentaram diferenças significativas entre quase todos os grupos. O grupo CONTROLE diferiu dos grupos LESAMA ($p = 0,000$) e LESBA ($p = 0,001$), bem como do grupo ODA (valor $p = 0,000$) (**figura 9**).

Em relação aos grupos de pacientes, observou-se diferenças significativas entre os portadores de lúpus de atividade moderada/alta e de baixa atividade (LESAMA : LESBA, $p = 0,037$), e entre pacientes com outras autoimunidades e lúpus de baixa atividade (ODA:LESBA,

$p=0,002$), entretanto, esta não se mantém quando comparados os grupos ODA e LESAMA (figura 9).

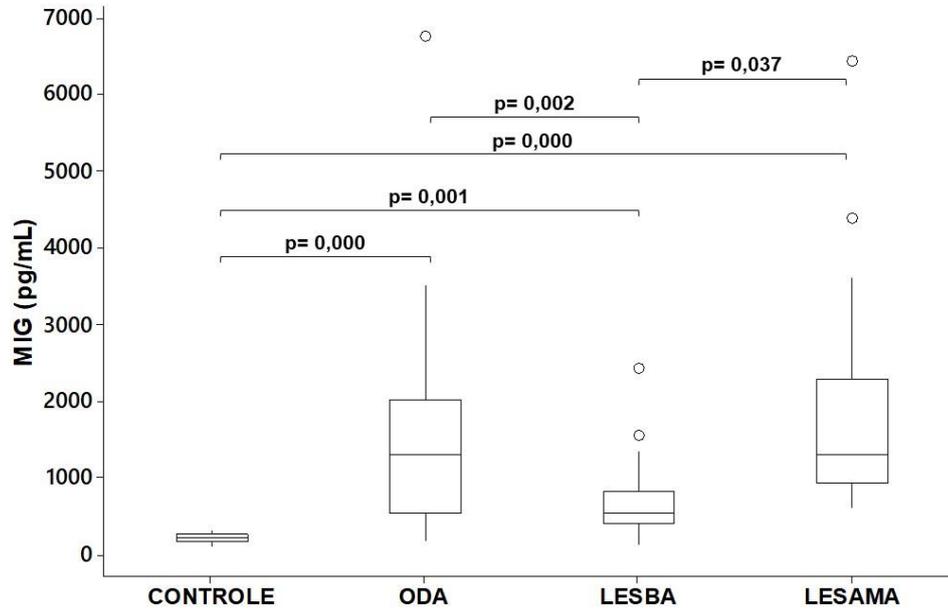


Figura 9. Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina MIG (CXCL9) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$).

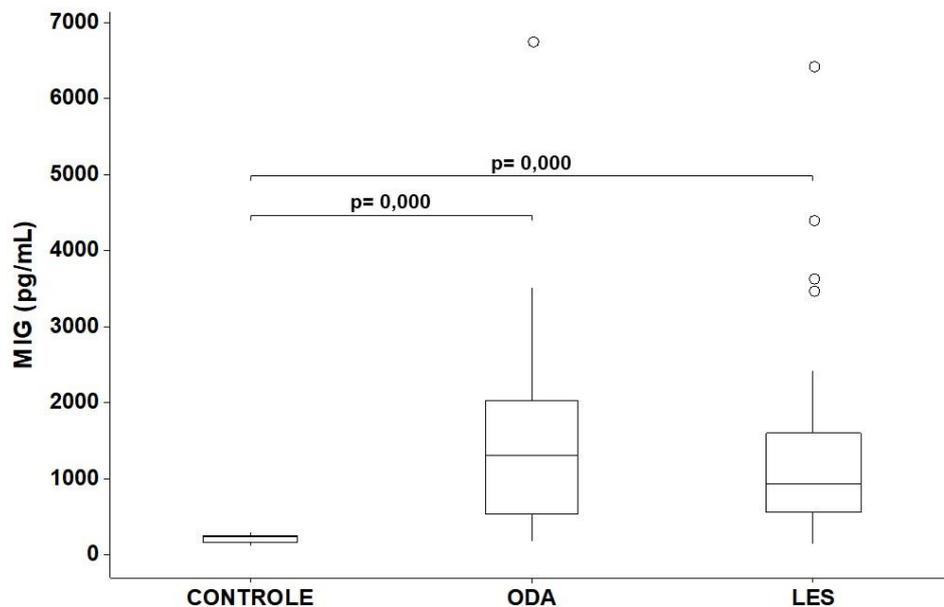


Figura 10. Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina MIG (CXCL9) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); e LES ($n = 46$).

Na **figura 10**, repete-se o observado anteriormente, identificando-se diferença significativa entre os grupos CONTROLE e ODA, bem como entre o primeiro e todos os pacientes com lúpus (CONTROLE : LES, $p= 0,000$). Porém, não foram encontradas diferenças ao se comparar grupos LES e ODA.

As concentrações foram mais elevadas no grupo ODA com valor de mediana (intervalo interquartil) igual à 1.302,00 pg/mL (537,00 – 2.022,00) e menores nos controles saudáveis, 217,20 pg/mL (166,70 – 258,20).

5.4.7 MIP-1 α

As análises dos níveis séricos da quimiocina MIP-1 α mostraram diferenças significativas entre as concentrações dos grupos LESAMA e LESBA ($p= 0,000$), e LESBA com o grupo ODA ($p= 0,000$), conforme apresentado na **figura 11**. As análises estatísticas evidenciaram também diferença significativa quando comparados os grupos LES e ODA ($p= 0,000$) (**figura 12**).

Não foram encontradas diferenças significativas entre os pacientes com LES e ODA em relação ao grupo CONTROLE.

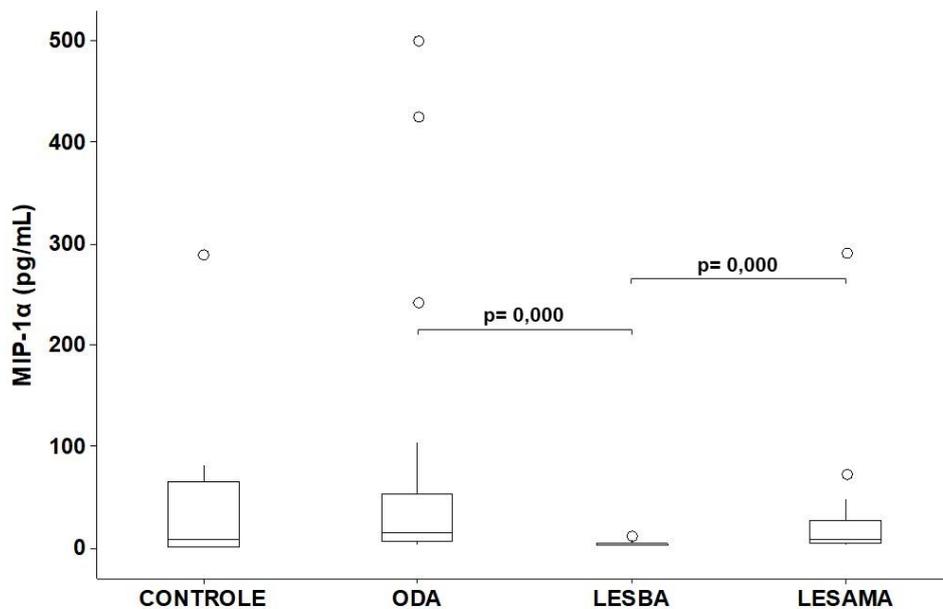


Figura 11. Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina MIP-1 α (CCL3) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$).

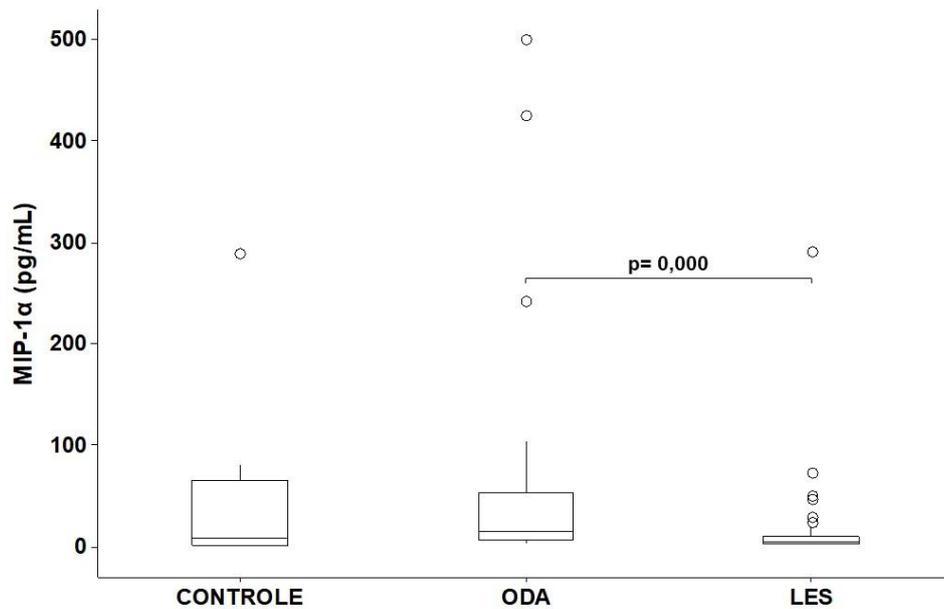


Figura 12. Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina MIP-1 α (CCL3) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); e LES ($n = 46$).

As concentrações da quimiocina MIP-1 α foram mais elevadas no grupo ODA com valor de mediana (intervalo interquartil) igual à 14,90 pg/mL (6,70 – 54,30) e mais baixas nos pacientes com LES, 4,84 pg/mL (2,90 – 10,36), sobretudo nos pacientes com baixa atividade da doença, 2,94 pg/mL (1,97 – 5,23).

5.4.8 RANTES

As análises das concentrações da quimiocina RANTES apresentaram resultados promissores semelhantes aos observados com MIG, evidenciando diferenças significativas entre quase todos os grupos em estudo. Tomando como referência o nível de significância de $p < 0,05$, verificou-se que há diferença estatisticamente significativa entre indivíduos saudáveis, inclusos no grupo CONTROLE, comparados aos grupos LESAMA ($p = 0,026$) e LESBA ($p = 0,001$), e ao grupo de indivíduos com outras autoimunes (ODA) ($p = 0,017$) (**figura 13**).

As análises também revelaram diferenças significativas entre os grupos de pacientes com LES em diferentes níveis de atividade da doença (LESBA : LESAMA, $p = 0,037$). O grupo de pacientes com outras doenças autoimunes apresentaram diferença significativa ao serem comparados com pacientes com LES de baixa atividade (ODA : LESBA, $p = 0,037$), porém

não foram encontradas diferenças quando comparados ao grupo de pacientes com LES de atividade moderada/alta (**figura 13**).

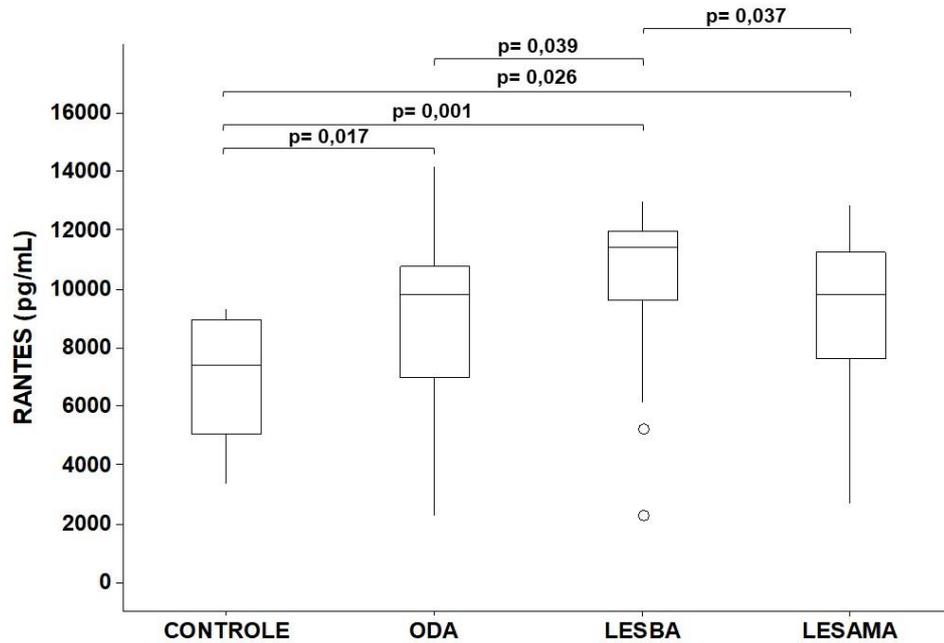


Figura 13. Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina RANTES (CCL5) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$).

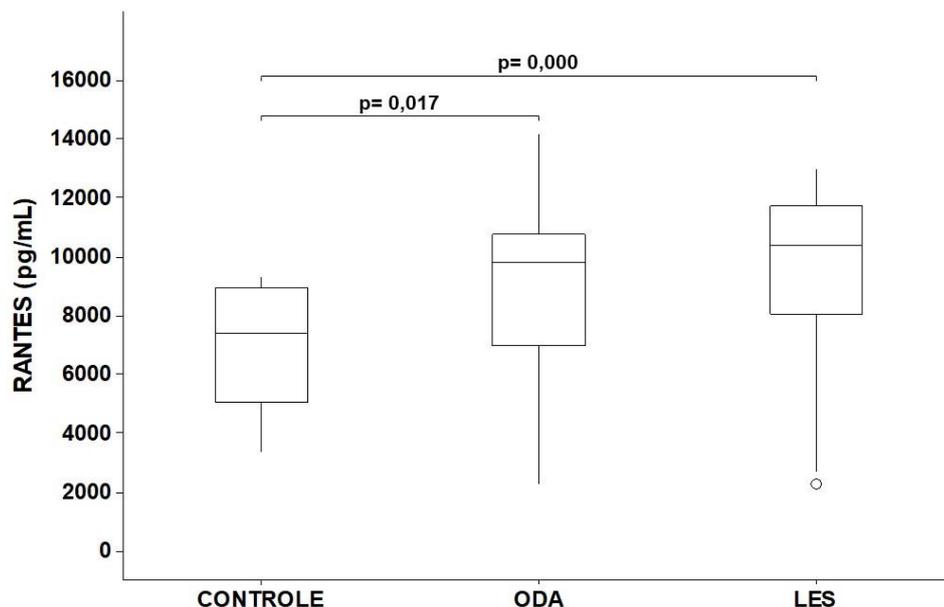


Figura 14. Boxplot representativo da concentração sérica da quimiocina RANTES (CCL5) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); e LES ($n = 46$).

Na **figura 14**, repete-se o observado anteriormente, identificando-se diferença significativa entre os grupos CONTROLE e ODA, bem como entre o primeiro e todos os

pacientes com lúpus (CONTROLE : LES, $p=0,000$). Porém, não foram encontradas diferenças ao se comparar grupos LES e ODA.

O grupo LES apresentou as concentrações mais elevadas de RANTES, com com valor de mediana (intervalo interquartil) igual à 10.417,00 pg/mL (8.057,00 – 11.712,00), em especial os pacientes com baixa atividade da doença, com mediana igual à 11.439,00 pg/mL (9.590,00 – 11.982,00). As concentrações mais baixas foram observada nos controles saudáveis com valor de mediana igual à 7.378,00 pg/mL (5.061,00 – 8.931,00).

5.4.9 VEGF

Assim como observado nas análises das citocinas INF- α e MCP-1, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quando avaliados os níveis séricos do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Os resultados das dosagens de VEGF foram mais elevadas em indivíduos com outras autoimunidades, com valor de mediana (intervalo interquartil) igual à 106,70 pg/mL (58,70 – 134,40), em relação aos demais grupos em estudo. As concentrações mais baixas foram observadas em pacientes com LES em atividade moderada/alta, mediana igual à 79,00 pg/mL (51,70 – 201,40). As concentrações estão apresentadas na **figura 15**.

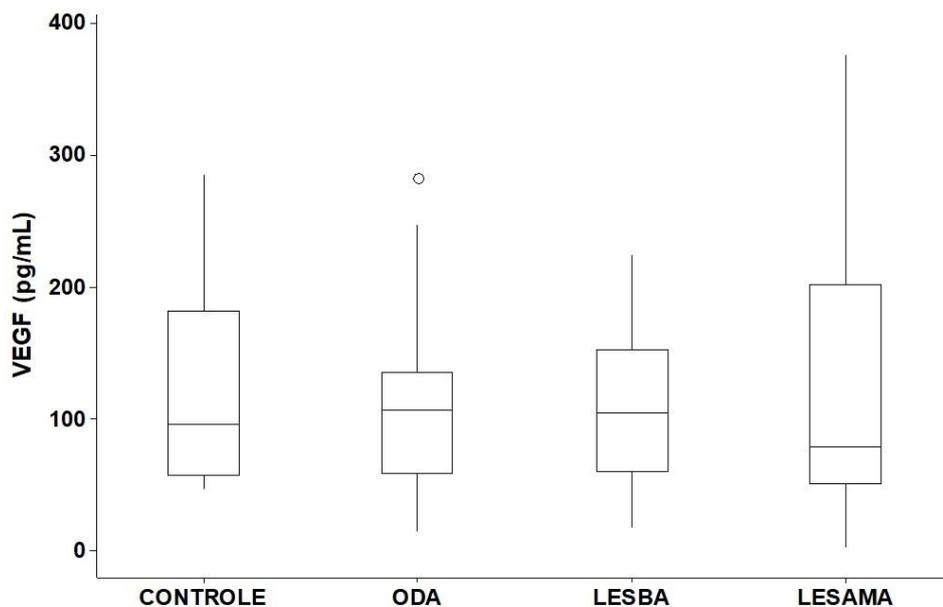


Figura 15. Boxplot representativo da concentração sérica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em amostras de soro dos participantes saudáveis – CONTROLE ($n = 8$); pacientes com autoimunidades – ODA ($n = 42$); LESBA ($n = 22$); e LESAMA ($n = 24$).

5.5 Resumo das avaliações dos biomarcadores

A **tabela 8** apresenta o resumo dos resultados obtidos com as análises estatísticas dos biomarcadores que apresentaram diferenças significativas entres os grupos do estudo.

Tabela 8. Relação dos principais biomarcadores selecionados segundo índice de significância ($p < 0,05$) na comparação entre grupos.

Associação comparativa	Biomarcadores				
	IL-8	IP-10	MIG	MIP-1 α	RANTES
CONTROLE x ODA	***	***	0,000	***	0,017
CONTROLE x LES	***	***	0,000	***	0,000
CONTROLE x LESBA	***	0,009	0,001	***	0,001
CONTROLE x LESAMA	***	0,023	0,000	***	0,026
ODA x LES	0,000	***	***	0,000	***
ODA x LESBA	0,000	0,008	0,002	0,000	0,039
ODA x LESAMA	0,024	***	***	***	***
LESBA x LESAMA	0,026	0,002	0,037	0,000	0,037

*** Ausência de significância. Valores numéricos apresentados representam valores de p obtido pelo teste Mann-Whitney.

Os biomarcadores ICAM-1, INF- α , MCP-1 e VEGF não apresentaram diferença significativa entre os grupos avaliados no estudo, desta forma, não constam da **tabela 8**. MIP-1 α apresentou diferença em três análises comparativas (entre pacientes do grupo ODA e LESBA; ODA e LES e entre LESBA e LESAMA).

A citocina IL-8 apresentou diferenças significativas entre os pacientes com diferentes autoimunidades, tanto entre os pacientes com LES, quanto entre estes e os pacientes do grupo ODA. A IP-10 apresentou diferença, assim como na IL-8, entre os grupos de pacientes com LES de baixa atividade e de atividade moderada/alta e entre os grupos ODA e LESBA. Em relação ao grupo CONTROLE nas dosagens de IP-10, foram encontradas diferenças significativas entre este e os grupos LESBA e LESAMA.

Os biomarcadores MIG e RANTES apresentaram os melhores resultados em relação aos demais, apresentando diferenças significativas em 6 das 8 análises comparativas, evidenciadas nas análises entre o grupo CONTROLE e os grupos dos pacientes do estudo (LES,

LESBA, LESAMA e ODA), entre o grupo ODA e de pacientes com lúpus de baixa atividade (LESBA) e entre os grupos de pacientes com lúpus, LESBA e LESAMA.

5.6 Correlações entre os biomarcadores avaliados com a idade e SLEDAI dos pacientes

A **figura 16** apresenta a correlação entre as idades dos pacientes com LES e ODA com as concentrações séricas dos biomarcadores avaliados no estudo.

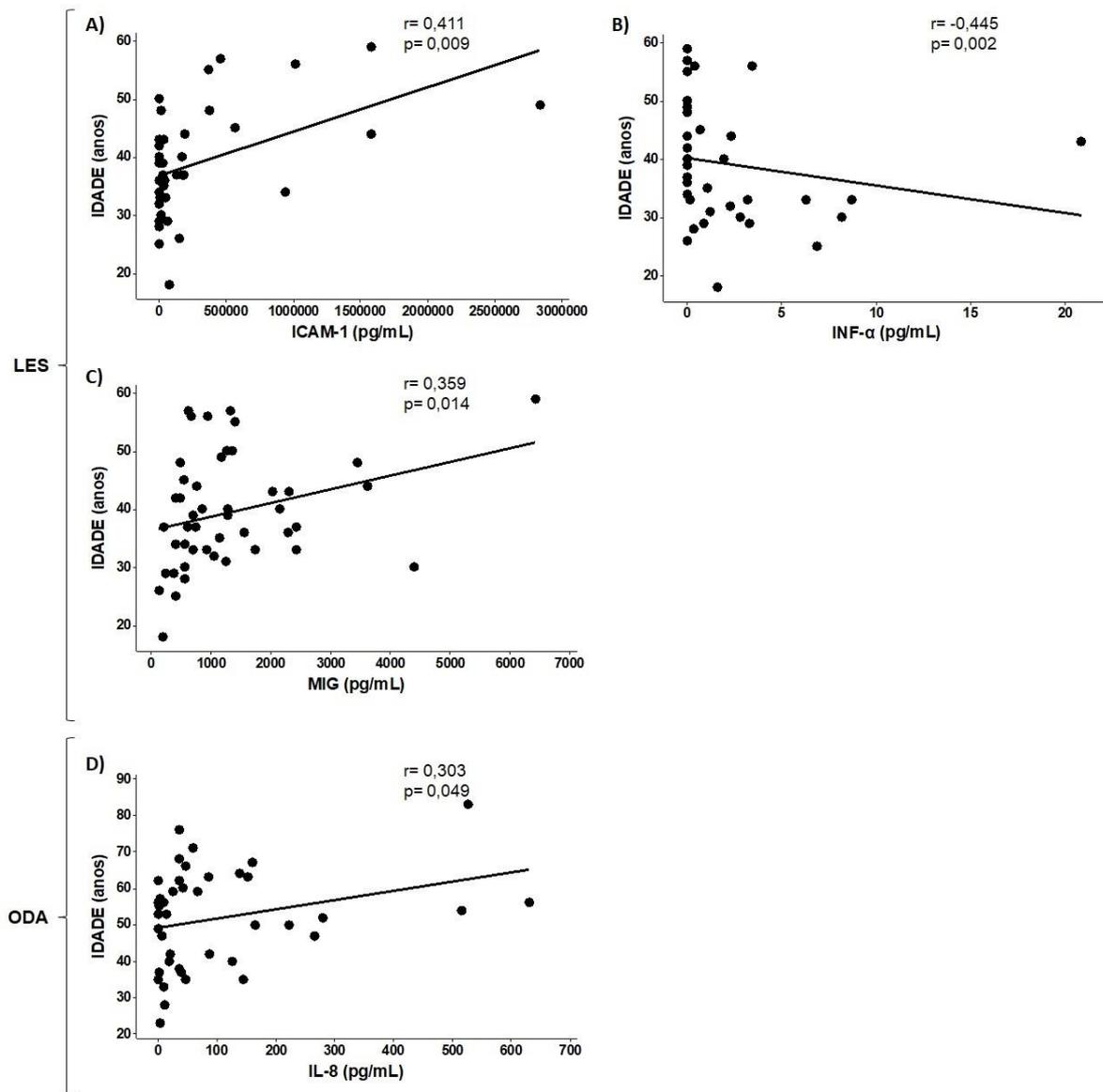


Figura 16. Gráficos de dispersão apresentando as correlações entre as idades dos pacientes com LES e as concentrações séricas de ICAM-1 (A), INF- α (B) e MIG (C); Idade dos pacientes com ODA e as concentrações séricas de IL-8 (D). Dados analisados pelo teste de correlação Rô de Spearman (valores significantes: $p < 0,05$).

Entre os pacientes com LES, as idades apresentadas no momento da coleta, correlacionaram positiva e significativamente com os biomarcadores ICAM-1 ($r= 0,411$; $p= 0,009$) e MIG ($r= 0,303$; $p= 0,049$), de forma moderada e fraca, respectivamente, sugerindo que os níveis do primeiro biomarcador tendem a ser mais elevados em pacientes com idades superiores. Por outro lado, os níveis séricos do biomarcador IFN- α apresentaram uma correlação negativa moderada com a idade, mas igualmente significativa, sugerindo que os níveis desta citocina tendem a reduzir com a idade.

Os dados de tempo de doença dos pacientes não apresentaram correlações estatisticamente significativas ao serem confrontados com as concentrações dos biomarcadores avaliados, desta forma, estes não foram apresentados.

A **figura 17** apresenta as correlações entre o SLEDAI 2k dos pacientes com LES e as concentrações séricas dos biomarcadores avaliados no estudo.

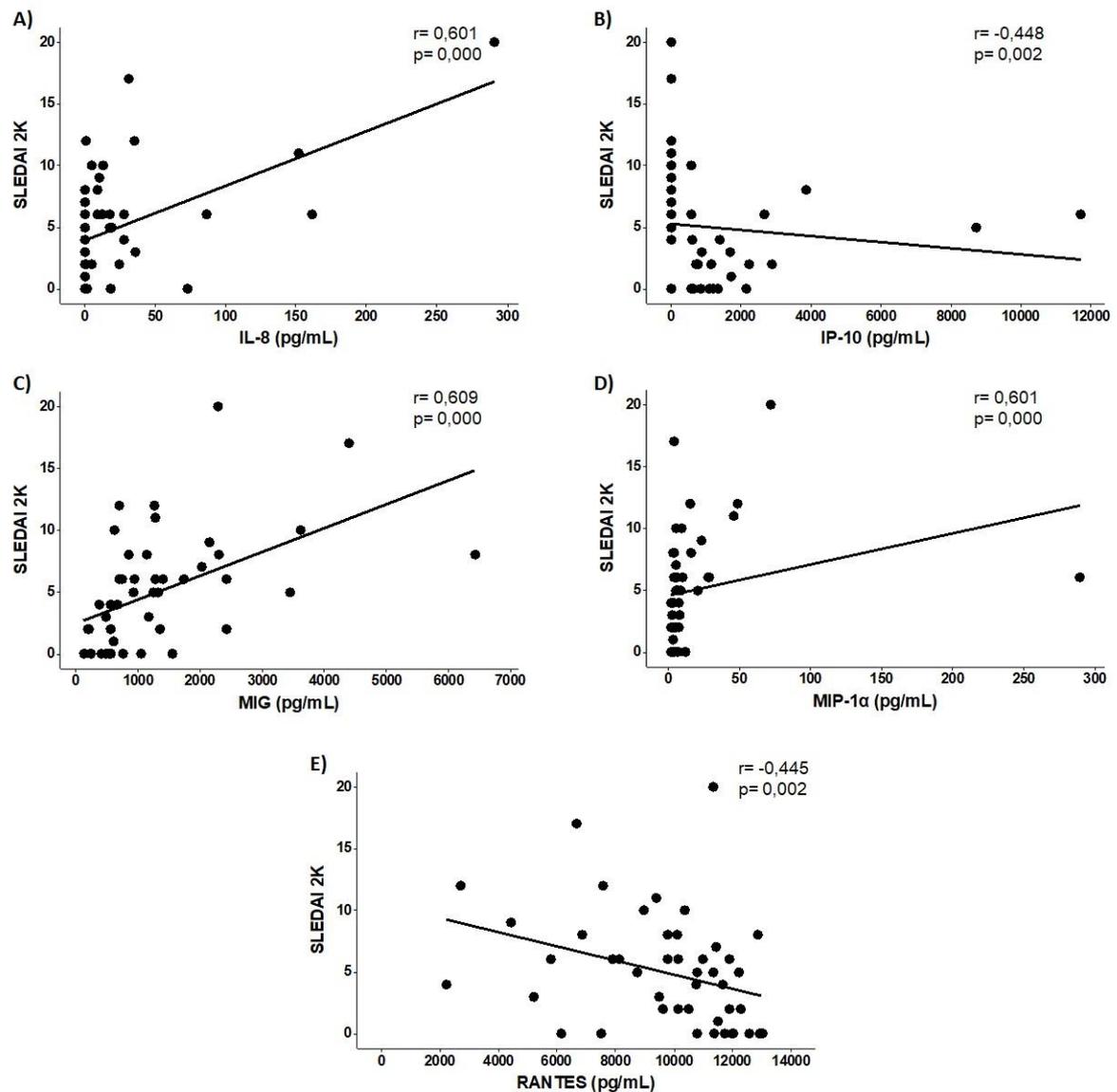


Figura 17. Gráficos de dispersão apresentando as correlações entre o SLEDAI 2k de pacientes com LES e concentrações séricas de IL-8 (A), IP-10 (B), MIG (C), MIP-1 α (D) e RANTES (E). Dados analisados pelo teste de correlação Rô de Spearman (valores significantes: $p < 0,05$).

As análises entre o SLEDAI 2k dos pacientes com LES e biomarcadores IL-8 ($r = 0,601$; $p = 0,000$), MIG ($r = 0,609$; $p = 0,000$) e MIP-1 α ($r = 0,601$; $p = 0,000$) apresentaram uma moderada correlação positiva e significativa, indicando, desta forma, que quanto maior o SLEDAI 2k, maior será a concentração destes biomarcadores no soro dos pacientes.

Ao contrário, os biomarcadores IP-10 ($r = -0,448$; $p = 0,002$) e RANTES ($r = -0,445$; $p = 0,002$) apresentaram correlação negativa moderada, porém significativa, quando comparados ao SLEDAI 2k dos pacientes com LES, sugerindo assim que as concentrações destes biomarcadores são inversamente proporcionais ao *score* calculado.

6. DISCUSSÃO

O LES é uma grave doença autoimune inflamatória crônica que afeta o tecido conjuntivo, em decorrência da perda do equilíbrio imunológico, levando a produção de diversos autoanticorpos e depósitos teciduais de imunocomplexos circulantes, expressando-se clínica e laboratorialmente de forma heterogênea, com largo espectro de manifestações clínicas em diversos órgãos e sistemas, sendo ainda uma patologia debilitante e fatal (YU *et al.*, 2014; MATHIAN *et al.*, 2015).

Os atuais métodos para o diagnóstico baseiam-se em complexos critérios associados a achados clínicos e laboratoriais comuns à doença, visto que, não há um exame único que o defina, bem como o fato de que tais achados também podem ser apresentados por outras desordens autoimunes sistêmicas. Associado a isto, os pacientes podem apresentar um número menor de manifestações, resultando assim, em uma menor sensibilidade e especificidade dos critérios atualmente empregados na definição do diagnóstico do LES (JUNE & AGGARWAL, 2014).

A busca por novas estratégias que auxiliem no desenvolvimento de novos métodos para o diagnóstico faz-se cada dia mais necessária, devido ao crescente número de pessoas acometidas pela doença, que, conforme Ahearn *et al.* (2012), sejam testes mais específicos, rápidos e menos invasivos do que os atualmente empregados.

Neste contexto, este trabalho se propôs a avaliar potenciais biomarcadores inflamatórios que possam auxiliar no diagnóstico do LES, bem como diferenciá-lo de outras autoimunidades sistêmicas, preferencialmente aqueles que se correlacionem com o estágio de atividade dos pacientes, para que, futuramente, possam ser utilizados na prática laboratorial através de exames como ELISA e/ou outros imunoensaios.

Pela primeira vez está sendo proposta a quantificação simultânea e comparativa das citocinas INF- α , IL-8, IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 α , RANTES, VEGF e da molécula de adesão ICAM-1, por citometria de fluxo associada à técnica de CBA, tendo em vista que a literatura, até o momento, revela resultados obtidos somente com a análise isolada destes analitos, por meio de teste de ELISA convencional, tais como a avaliação de INF- α no monitoramento da atividade do LES (ROSE *et al.*, 2017), MIP-1 α e RANTES associado a manifestações clínicas, atividade e dano tecidual (VILÁ *et al.*, 2007) e ICAM-1 associado a pacientes com nefrite (SABRY *et al.*, 2007).

Em função da grande predominância do LES no gênero feminino, foram recrutadas 46 mulheres com idades superior ou igual a 18 anos. As médias das idades dos grupos foram de $39,64 \pm 9,61$ anos entre as pacientes com LES, sendo $36,55 \pm 9,51$ anos entre os pacientes com baixa atividade (SLEDAI ≤ 4) e $42,29 \pm 11,09$ anos entre os pacientes com atividade moderada/alta (SLEDAI > 4), $51,93 \pm 13,48$ anos para o grupo ODA (42 pacientes). Este último grupo apresentou a média de idade mais alta devido à inclusão de pacientes com artrite reumatóide, que são em sua maioria indivíduos idosos. Para o grupo de indivíduos controles (8 voluntárias), a média de idade foi de $43,52 \pm 11,09$ anos. Resultados semelhantes foram observados em estudo realizado por Higgs *et al.* (2011), em que as médias de idades foram de $43,00 \pm 1,90$ anos para pacientes com LES, $39,80 \pm 9,40$ anos para controles saudáveis e $52,80 \pm 13,20$ para outras doenças autoimunes.

Pacientes com LES podem apresentar diferentes achados laboratoriais aplicáveis ao diagnóstico da doença. Em nosso estudo, os achados clínicos-laboratoriais mais frequentes, no momento do diagnóstico, foram a presença de fator antinuclear (FAN-Hep2), apresentado por 91% dos voluntários, alterações hematológicas (76%) e imunológicas (70%) e pacientes com quadro de glomerulonefrite (70%). Os achados menos recorrentes entre os pacientes do estudo foram as lesões discóides (22%) e desordens neurológicas (15%). Estudo conduzido por Pacheco *et al.* (2017) na Colômbia, revelou dados semelhantes, no qual as manifestações mais observadas foram FAN-Hep2 positivo (87%), achados imunológicos (81%) e hematológicos (72%), e com menor incidência os distúrbios neurológicos (18%) e lesões discóides (10%).

Dados laboratoriais obtidos dos prontuários médicos dos pacientes mostraram algumas diferenças significativas quando comparados os grupos LES e ODA. Foram observadas diferenças no leucograma, nas contagens globais de leucócitos, linfócitos e na relação neutrófilos/linfócitos, sendo as menores médias encontradas nos pacientes com lúpus. A única exceção ocorreu quando comparados os grupos LESAMA e ODA, com a contagem de monócitos estatisticamente diferente, em que o primeiro apresentou uma média significativamente maior. Estes resultados podem estar associados ao fato de muitos pacientes com LES apresentarem quadro de leucopenia e linfopenia em decorrência do tratamento adotado, como o uso de imunossupressores. Como dito anteriormente, as menores médias foram observadas neste grupo, sendo esta uma das características clínicas da doença e estando mais acentuada nos pacientes com maior índice de atividade da doença (CARLI *et al.*, 2015).

Nos dados laboratoriais complementares dos pacientes, a concentração sérica do componente C3 do complemento foi diferente entre os grupos de pacientes com lúpus de baixa atividade (LESBA) e atividade moderada/alta (LESAMA). Vários estudos mostram que em pacientes com a doença ativa, os níveis de C3 é menor (BIRMINGHAM *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2013; GANDINO *et al.*, 2017). Em relação à velocidade de hemossedimentação (VHS), pacientes com lúpus apresentaram resultados inferiores, sobretudo no grupo LESBA em relação a ODA, sugerindo assim um perfil inflamatório mais brando em pacientes com lúpus de baixa atividade em relação a outras doenças autoimunes avaliadas neste estudo. Da mesma forma, foi observada diferença significativa na concentração de albumina sérica entre os grupos ODA e LESAMA, sendo menor no grupo de pacientes com lúpus, possivelmente devido ao envolvimento renal. Conforme observado em estudos realizados por Yip *et al.* (2010), a concentração sérica de albumina foi menor em pacientes com lúpus em alta atividade, sobretudo naqueles pacientes que apresentavam quadro de nefrite.

Os medicamentos são componentes essenciais no tratamento de pacientes com doenças autoimunes sistêmicas, consistindo tradicionalmente no uso de agentes imunossupressores, como azatioprina e ciclofosfamida, e corticosteróides.

Em pacientes com LES, além dos medicamentos tradicionais, o tratamento pode ser associado a outros fármacos como antimaláricos (hidroxicloroquina e difosfato de cloroquina) que atuam na redução de manifestações mucocutâneas, musculoesqueléticas e sintomas constitucionais (febre e fadiga) característicos da doença. Além do mais, o uso de anti-inflamatórios não esteroidais também pode ser aplicado na terapêutica em resposta à sintomas como artralgias, serosite, mialgia entre outras manifestações de curso inflamatório apresentadas pelos pacientes. Cumpre ressaltar ainda a possibilidade do uso de novas terapias, como a administração de micofenolato de mofetil e metotrexato (agentes imunossupressores), dentre outros medicamentos específicos direcionados a marcadores de superfície celular, como rituximabe (AMISSAH-ARTHUR & GORDON, 2010; KHUN *et al.*, 2015).

Entre os pacientes de nosso estudo, a maioria do grupo LES, faziam uso de corticosteróide (prednisona, 78,26%) e antimalárico (hidroxicloroquina, 63,04%), dados semelhantes foram encontrados em estudos realizados por Kojuri *et al.* (2012), que, observaram que os pacientes faziam maior uso de prednisona (76,61%) e hidroxicloroquina (65,32%). Os pacientes com outras autoimunidades, por outro lado, faziam menos uso de medicamentos,

sendo o metotrexato (27,27%) e prednisona (25%) os mais utilizados e, em alguns casos eram empregados fármacos à base de anticorpos monoclonais, como rituximabe (4,55%).

Diversos estudos indicam que os medicamentos utilizados no tratamento do LES podem alterar diretamente a produção de citocinas, em especial, os corticosteróides e antimaláricos. Estudos realizados por Hu *et al.* (2003) e Flammer *et al.* (2010) mostraram efeito inibidor da via de sinalização de IFN- γ por corticóides, podendo assim, envolverem-se na alteração da produção de outras citocinas dependentes de IFN- γ . Similarmente, em estudos realizados por Xie *et al.* (2002) e Prado *et al.* (2011) observou-se alterações na expressão de citocinas envolvidas nas respostas Th1, Th2 e Th17 ocasionadas pelo tratamento com estes fármacos. Willis *et al.* (2012) ao avaliarem os efeitos da hidroxicloroquina em pacientes com LES, observaram que esta terapia está fortemente associada com a redução dos níveis séricos de IFN- α , enquanto que Da Silva *et al.* (2013), em estudos *in vitro*, observaram que hidroxicloroquina reduz a concentração de citocinas relacionadas à resposta Th17.

Visto que a maioria dos pacientes com LES avaliados em nosso estudo estão sob tratamento com estes fármacos (prednisona, 78,26%; hidroxicloroquina, 63,04%), há possibilidade que estes efeitos reflitam diretamente nas concentrações séricas de algumas citocinas inflamatórias, principalmente na produção de IFN- α , revelando um perfil diferente do esperado em pacientes virgens de tratamento. Em virtude da demora na confirmação do diagnóstico bem como a severidade da doença, há forte recomendação por início imediato da terapia, fato que dificulta a interpretação dos resultados das análises laboratoriais como um todo, constituindo uma limitação do presente estudo.

Estudos apontam uma forte associação entre a desregulação da produção de citocinas e a fisiopatologia do LES, pois estas assumem um papel crítico na diferenciação, maturação e ativação celular, na perda da tolerância imunológica, além de participarem também dos processos inflamatórios locais que acarretam as lesões teciduais características da doença (POSTAL *et al.*, 2013; YAP & LAI, 2013).

Neste contexto, o presente estudo se propôs a avaliar um painel de biomarcadores (citocinas – INF- α , IL-8, IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 α , RANTES, VEGF e a molécula de adesão celular – ICAM-1), que apresentam correlação com a patogênese do LES. Foi empregada pela primeira vez a técnica de CBA na avaliação destes marcadores inflamatórios no LES. Além do mais, como caráter inovador, os pacientes com LES foram comparados a pacientes com outras condições autoimunes, com a finalidade de buscar, dentre estes

marcadores algum que possa diferir estes grupos entre si, e entre esses e voluntários saudáveis. Ressalta-se também o fato que são escassos os estudos que utilizam a técnica de CBA na avaliação das concentrações destes biomarcadores referidos, sendo que a maioria destes emprega a técnica de ELISA e/ou método de imunoadsorção enzimática avidina-biotina.

Uma análise dos dados do presente estudo revela perspectivas promissoras ao se comparar as quimiocinas IL-8, IP-10, MIG, MIP-1 α e RANTES entre os grupos do estudo, entretanto, resultados satisfatórios não foram alcançados quando avaliadas as citocinas IFN- α , MCP-1, VEGF e ICAM-1.

A IL-8 é uma importante mediadora do processo inflamatório envolvida na ação quimiotática de leucócitos, atuando principalmente no recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório (RUSSO *et al.* 2014). Em pacientes com doenças autoimunes, estudos apontam que a IL-8 está elevada em portadores de LES, com acometimento pulmonar (fibrose), renal (nefrite), e, podendo ainda, correlacionar-se com a atividade da doença, bem como apresentar-se elevada em pacientes portadores de artrite reumatóide, sob tratamento, em comparação a indivíduos saudáveis (ROVIN *et al.*, 2002; OKAMOTO *et al.*, 2010; NIELEPKOWICZ-GOŹDZIŃSKA *et al.*, 2014).

Em nossas análises, contrariando a maioria dos estudos, tais como conduzidos por Vega *et al.* (2010) e Rodríguez-Carrio *et al.* (2014), as concentrações séricas de IL-8 não apresentaram diferença estatística entre os grupos de pacientes com LES e os controles saudáveis. Entretanto, foi observado no presente estudo que as concentrações de IL-8 em pacientes com LES foram menores em relação ao grupo controle, em concordância com Hrycek *et al.* (2013). Tal observação pode estar associada ao tratamento farmacológico aplicado aos doentes, visto que em nosso estudo, 76,61% dos pacientes faziam uso de corticóides, diferentemente do estudo conduzido por VEGA *et al.* (2010), em que se avaliou os efeitos do tratamento sobre a secreção de quimiocinas, apenas 33,33% dos pacientes faziam uso do citado medicamento. O fato da maioria dos pacientes envolvidos em nosso estudo estar em uso de corticoides poderia explicar, pelo menos em parte o efeito supressor sobre os níveis da IL-8, bem como justificar a diferença nos resultados do estudo de Vega *et al.* (2010) e os nossos.

Dantas *et al.* (2017) ao avaliarem a produção de quimiocinas em pacientes com esclerose sistêmica tratados com corticóides também relataram o mesmo efeito supressor sobre a IL-8. Entre os pacientes do grupo ODA, o uso deste fármaco foi identificado em apenas 25% do total de participantes, como pode ser observado na tabela 7. Conforme as figuras 4 e 5, a IL-

8 está em concentrações maiores no grupo ODA do que no grupo LES. No entanto, da mesma forma, não se observou diferença ao se comparar os grupos ODA e controle quanto aos níveis de IL-8.

Quando as concentrações séricas de IL-8 dos pacientes com LES foram comparadas às do grupo ODA, foi observada diferença significativa entre estes, mesmo quando o grupo LES foi estratificado em diferentes níveis de atividade da doença definido pelo *score* SLEDAI (baixa atividade e moderada/alta), sugerindo desta forma que este biomarcador pode auxiliar na distinção do LES de outras autoimunidades sistêmicas. No entanto, não foram encontrados na literatura estudos que realizaram análises comparativas quanto à produção de IL-8 entre pacientes acometidos com LES em relação a outras doenças autoimunes sistêmicas, fato que contribui para o ineditismo da presente investigação.

Estudos apontam uma correlação positiva entre a quimiocina IL-8 com a atividade do LES observada em pacientes com envolvimento renal (HOLCOMBE *et al.*, 1994) e pulmonar (NIELEPKOWICZ-GOŹDZIŃSKA *et al.*, 2014). Nossos dados mostraram, de forma semelhante, que a IL-8 apresenta diferença significativa ao ser avaliada em pacientes com LES com diferentes índices de atividade, sendo que os níveis séricos de IL-8 aumentaram em função do aumento da atividade da doença.

Dados acerca da quimiocina IP-10 indicam que seu aumento está associado a doenças inflamatórias, como distúrbios autoimunes, além de ser um importante indicador da severidade de diversas doenças (LIU *et al.*, 2011; ANTONELLI *et al.*, 2014). Conforme reportado por Narumi *et al.* (2002), Bauer *et al.* (2009) e Kong *et al.* (2009), ao quantificarem IP-10 por ELISA, foi observada correlação entre os níveis desta quimiocina e a atividade do LES. Por outro lado, Narumi *et al.* (2002) reportaram que as concentrações séricas de IP-10 de pacientes com algum nível de atividade de LES diferiram daquelas de pacientes com artrite reumatóide.

Nossos achados, assim como nos estudos anteriormente citados, correlacionaram a IP-10 com a atividade do LES. Entretanto, as concentrações de IP-10, contrariamente, foram mais elevadas em pacientes com baixa atividade da doença e mais baixas em pacientes com maior grau de atividade da doença. Analogamente ao que foi observado na avaliação da IL-8, tal resultado inesperado pode estar associado ao tratamento farmacológico, principalmente com corticosteroides. Ao avaliarem a resposta imune sistêmica a esta classe de medicamento, Olnes *et al.* (2016), constataram a redução da concentração sérica de IP-10, que juntamente com outras quimiocinas, foram mais susceptíveis à hidrocortisona. Em relação aos demais grupos,

diferença significativa foi observada entre o grupo de pacientes com LES em baixa atividade e grupo controle, e ainda com o grupo de outras doenças autoimunes. O mesmo aconteceu quando os pacientes com LES em atividade moderada/alta foram comparados com aqueles com baixa atividade da doença. Nossos dados relativos a IP-10 não permitem confirmar seu papel auxiliar no diagnóstico do LES em atividade, muito provavelmente pelo efeito redutor dos níveis desta quimiocina consequente ao tratamento (provavelmente mais intenso naqueles mais graves) utilizado pelos pacientes no momento da coleta do sangue, o que constitui uma limitação do nosso estudo.

Embora a participação da quimiocina MIP-1 α na resposta a infecções agudas e crônicas esteja comprovada (MAURER & VON STEBUT, 2004; DAPUNT *et al.*, 2014), alguns estudos vem associando esta citocina a outras condições inflamatórias, como o LES por exemplo, participando do desenvolvimento de manifestações cutâneas, hematológicas e renais, bem como da indução da atividade da doença (BAUER *et al.*, 2006; VILÁ *et al.*, 2007; LU & NOSSENT, 2015).

Todavia, nossos achados, ao avaliarmos MIP-1 α por CBA, não mostraram diferença significativa entre pacientes com LES e indivíduos saudáveis, corroborando com achados de Kaneko *et al.* (1999) e Vilá *et al.* (2007) que dosaram por ELISA esta quimiocina, em populações japonesas e porto-riquenhas, respectivamente. Tais autores concluíram que mesmo em diferentes populações, as taxas séricas entre pacientes e controles saudáveis, tendem a não apresentarem variações significativas. No entanto, no presente estudo foram identificadas diferenças significativas ao se comparar o grupo de pacientes com LES com aqueles com outras doenças autoimunes. Porém, ao se avaliar os grupos de pacientes com lúpus com diferentes níveis de atividade, diferença foi significativa para MIP-1 α entre tais grupos e, ainda, entre pacientes com baixa atividade e o grupo com outras doenças autoimunes, mas não apresentou resultado semelhante ao avaliar pacientes com LES de atividade moderada/alta e o grupo ODA. Não foram encontrados na literatura estudos que avaliassem os níveis séricos de MIP-1 α em pacientes com LES ou em outras doenças autoimunes, o que vem corroborar com o ineditismo do presente estudo.

Estudos conduzidos por Bauer *et al.* (2006) indicam a participação da MIP-1 α na inflamação sistêmica associada ao LES. Dessa forma, parece ser bastante coerente a correlação positiva observada por nós entre a concentração sérica da MIP-1 α e o SLEDAI, ou seja, elevando-se conforme maior pontuação apresentada pelos pacientes. Tal correlação está em

consonância com o encontro de diferença significativa quando comparados os grupos de pacientes com baixa atividade e moderada/alta. Estes achados condizem com os dados observados por Ferreira *et al.* (2010) ao avaliarem os níveis plasmáticos de quimiocinas em pacientes com LES sob tratamento. Petrackova *et al.* (2017) ao correlacionarem lesões em órgãos de pacientes com LES com o padrão de proteínas séricas, observaram aumento de MIP-1 α , proporcionalmente ao índice de injúria observado, o que reflete a atividade da doença e assim corroborando com nossos achados.

As quimiocinas MIG e RANTES estão amplamente associadas aos processos inflamatórios em resposta a patógenos e a outras condições, por exemplo autoimunidade, atuando no recrutamento celular, na manutenção da inflamação e, no caso da MIG, em processos de reparação de danos teciduais e inibição da angiogênese (KRENSKY & AHN, 2007; BERTHOUD *et al.*, 2009; ELSAADANY *et al.*, 2011; GAMBICHLER *et al.*, 2011; DUQUE & DESCOTEAUX, 2014). Em estudos com pacientes com LES foi observado aumento significativo de RANTES (ZHAO *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2012) e MIG (LIT *et al.*, 2006; KARONITSCH *et al.*, 2009) em comparação a indivíduos saudáveis. Além disso, em outros estudos, demonstrou-se que estas citocinas se correlacionaram com a atividade da doença (BAUER *et al.*, 2006; VILÁ *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2010).

Outros estudos apontam elevados níveis de MIG e RANTES em pacientes com diferentes distúrbios autoimunes, como artrite reumatóide (ELSAADANY *et al.*, 2011; SUCUR *et al.*, 2017), esclerose sistêmica (RABQUER *et al.*, 2011; BANDINELLI *et al.*, 2012) e síndrome de Sjögren primária, que apresentaram níveis séricos elevados de MIG (TRIPP *et al.*, 2016) e níveis elevados de RANTES na saliva (LEE *et al.*, 2010).

Nossos dados, de forma semelhante aos observados na literatura, evidenciaram níveis mais elevados de MIG e RANTES em pacientes com LES ou ODA em relação ao grupo controle, apresentando concentrações significativamente diferentes, inclusive quando comparou-se o grupo controle a pacientes com baixa atividade e com atividade modera/alta. Tal fato sugere que estas quimiocinas participam ativamente do estado inflamatório destes pacientes, independentemente do grau de acometimento que apresentem, o que futuramente, pode ser relevante no aprimoramento do diagnóstico desta patologia.

Ao se comparar o grupo LES com o ODA não foi observada diferença significativa. Os pacientes com outras doenças autoimunes apresentaram níveis séricos elevados de MIG e RANTES em comparação a controles saudáveis. Não foram encontrados na literatura estudos

que avaliaram simultaneamente os níveis séricos destas quimiocinas em distúrbios autoimunes sistêmicos, limitando a discussão destes achados, sendo que a grande maioria desses estudos utilizaram a técnica de ELISA ao mensurar estes analitos.

No presente estudo, também foram avaliadas as concentrações de MIG e RANTES em pacientes com diferentes graus de atividade do LES, ou seja, dos grupos LESBA e LESAMA, tendo sido observadas, assim como nas quimiocinas IL-8, IP-10 e MIP-1 α , diferenças significativas entre os grupos. Conforme dados observados por Ferreira *et al.*, (2010) as concentrações de MIG apresentaram correlação positiva com o SLEDAI, onde as concentrações mais baixas foram obtidas em pacientes com atividade menor ou igual a 4, enquanto as mais altas em pacientes com atividade maior que 4. Achados semelhantes foram também observados por Bauer *et al.* (2006), o que vem atestar um importante papel para esta quimiocina como mediadora do processo inflamatório. MIG também apresentou correlação positiva com a idade dos pacientes, coerente com o achado da média etária mais elevada pacientes com maior atividade da doença. Quanto às concentrações de RANTES, nossos achados corroboraram com dados de Kaneko *et al.* (1999), os quais observaram uma correlação negativa com a atividade do LES. Pelos achados do presente estudo, MIG e RANTES apresentaram resultados promissores para determinação de potenciais biomarcadores para o monitoramento da atividade no LES.

Não foram evidenciadas diferenças entre os grupos estudados nas análises da molécula de adesão ICAM-1, interferon alfa (IFN- α), da quimiocina MCP-1 e do fator de crescimento VEGF. Alguns fatores podem estar associados a esta condição, como o tratamento a que os pacientes estão submetidos, que, como relatado anteriormente, pode influenciar a produção de citocinas. Em relação ao fator de crescimento vascular endotelial, em estudos conduzidos por Merayo-Chalico *et al.* (2017) também não foram evidenciadas diferenças significativas entre pacientes com LES exibindo diferentes graus de atividade em relação a controles saudáveis. ICAM-1 e IFN- α apresentaram, respectivamente, correlação positiva e correlação negativa com a idade dos pacientes com a doença, ou seja, as concentrações de ICAM-1 aumentaram com a idade, enquanto as concentrações de IFN- α diminuíram.

Por fim, deve-se ressaltar a importância na busca de biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico precoce e no monitoramento do LES, visto que se trata de uma doença altamente debilitante, podendo evoluir à óbito. Pela primeira vez, empregou-se a técnica CBA para a dosagem simultânea dos biomarcadores descritos neste estudo, em casos de LES e de outras

importantes doenças autoimunes, o que permitiu conhecer a expressão das citocinas nestas diferentes doenças de caráter autoimune. Neste contexto, acredita-se que o presente estudo possa representar um avanço na pesquisa de marcadores diagnósticos e de predição de atividade da doença. Tendo em vista a participação destas moléculas no processo inflamatório do LES e de outras doenças autoimunes, estes dados poderão contribuir para um melhor entendimento de aspectos fisiopatológicos da doença em estudo. Vislumbra-se também nesse estudo, a possibilidade futura do rastreamento de algumas dessas citocinas no soro para o diagnóstico complementar da doença ou mesmo no monitoramento de sua atividade. Entretanto, deve-se salientar, que este estudo ainda é uma avaliação preliminar, sendo necessária a validação dos dados apresentados.

7. CONCLUSÃO

A partir deste estudo, pode-se concluir que:

A maioria das citocinas avaliadas apresentaram um diferente perfil de expressão tanto no LES como em outras doenças autoimunes;

Não foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos estudados nas análises da molécula de adesão ICAM-1, interferon alfa (IFN- α), MCP-1 e do fator de crescimento VEGF;

Os níveis das quimiocinas IL-8, IP-10, MIP-1 α , RANTES e MIG se mostraram associados à atividade do LES sendo promissores, portanto, para determinação de potenciais biomarcadores para o monitoramento da atividade no LES;

Os níveis das quimiocinas IL-8 e MIP-1 α se mostraram diferentes entre os pacientes com LES e com outras doenças autoimunes sendo promissores, portanto, para auxiliar na diferenciação entre ambos os grupos;

Os níveis das quimiocinas MIG e RANTES se mostraram diferentes entre o grupo controle, e ambos os grupos de LES e outras doenças autoimunes sendo promissores, portanto, para auxiliar no diagnóstico de doença autoimune de modo geral, em casos suspeitos;

Tais biomarcadores apresentam potencial para maiores estudos desta natureza, à procura de uma ferramenta auxiliar no diagnóstico de atividade do LES, bem como na diferenciação entre o LES e outras doenças autoimunes, ambas situações desafiadoras para a clínica reumatológica.

8. PERSPECTIVAS

Deve-se salientar que os dados apresentados neste estudo são preliminares e, indubitavelmente, outras investigações complementares, valendo-se de uma amostragem mais robusta, são necessárias para a confirmação e validação destes resultados. Como oportuna complementação, à época, deverão ser avaliadas também a reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade, preferencialmente, utilizando-se ensaios de menor custo como os imunoenzimáticos.

Uma maior amostragem possibilitará a estratificação dos pacientes com LES em função de algumas características de grande importância clínica, como a presença ou não de nefrite lúpica. Por outro lado, também será possível correlacionar os níveis das diferentes citocinas com outras manifestações clínicas tais como lesões cutâneas, alterações hematológicas, imunológicas, artrite e outras, além de melhor ou pior prognóstico.

REFERÊNCIAS

- ADAN, A.; ALIZADA, G.; KIRAZ, Y.; BARAN, Y.; NALBANT, A. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 163–176, 2017.
- ADHYA, Z.; BOROZDENKOVA, S.; KARIM, M. Y. The role of cytokines as biomarkers in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 26, n. 10, p. 3273–3280, 2011.
- AGGARWAL, R.; RINGOLD, S.; KHANNA, D.; NEOGI, T.; JOHNSON, S.R.; MILLER, A.; BRUNNER, H.I.; OGAWA, R.; FELSON, D.; OGDIE, A.; ALETAHA, D.; FELDMAN, B.M. Distinctions between diagnostic and classification criteria? **Arthritis Care & Research**, v. 67, n. 7, p. 891-897, 2015.
- 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.
- ALEEM, A.; AL ARFAJ, A.S.; KHALIL, N.; ALARFAJ, H. Hematological abnormalities in systemic lupus erythematosus. **ACTA Rheumatology of Portugal**, v. 39, 236–241, 2014.
- AMISSAH-ARTHUR, M.B.; GORDON, C. Contemporary treatment of systemic lupus erythematosus: an update for clinicians. **Therapeutic advances in chronic disease**, v. 1, n. 4, p. 163-175, 2010.
- ANTAL-SZALMÁS, P.; NAGY JR., B.; EBRECENI, I.B.; KAPPELMAYER, J. Measurement of soluble biomarkers by flow cytometry. **EJIFCC**, v. 23, n. 4, p. 135–142, 2013.
- ANTONELLI, A.; FERRARI, S.M.; GIUGGIOLI, D.; FERRANNINI, E.; FERRI, C.; FALLAHI, P. Chemokine (C-X-X motif) ligand (CXCL) 10 in autoimmune diseases. **Autoimmunity reviews**, v. 13, n. 3, p. 272-280, 2014.
- APOSTOLIDIS, S.A.; LIEBERMAN, L.A.; KIS-TOTH, K.; CRISPÍN, J.C.; TSOKOS, G.C. The Dysregulation of Cytokine Networks in Systemic Lupus Erythematosus. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 31, n. 10, p. 769–779, 2011.
- ATERIDO, A.; JULIÀ, A.; CARREIRA, P.; BLANCO, R.; LÓPEZ-LONGO J.J.; VENEGAS, J.J.P.; OLIVÉ, À.; ANDREU, J.L.; AGUIRRE-ZAMORANO, M.Á.; VELA, P.; NOLLA,

J.M.; MARENCO-DE LA FUENTE, J.L.; ZEA, A.; PEGO, J.M.; FREIRE, M.; DÍEZ, E.; LÓPEZ-LASANTA, M.; LÓPEZ-CORBETO, M.; PALAU, N.; TORTOSA, R.; GELPÍ, J.L.; ABSHER, D.; MYERS, R.M.; FERNÁNDEZ-NEBRO, A.; MARSAL, S. Genome-wide pathway analysis identifies VEGF pathway association with oral ulceration in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research and Therapy**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2017.

BANDINELLI, F.; DEL ROSSO, A.; GABRIELLI, A.; GIACOMELLI, R.; BARTOLI, F.; GUIDUCCI, S.; CERINIC, M.M. CCL2, CCL3 and CCL5 chemokines in systemic sclerosis: the correlation with SSc clinical features and the effect of prostaglandin E1 treatment. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 30, n. 2, p. 44-49, 2012.

BARBHAIYA, M.; COSTENBADER, K. Ultraviolet radiation and systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 23, n. 6, p. 588–595, 2014.

BĂRBULESCU, A.L.; VREJU, A.F.; BUGĂ, A.M.; SANDU, R.E.; CRIVEANU, C.; TUDORASCU, D.R.; GHEONEA, I.A.; CIUREA, P.L. Vascular endothelial growth factor in systemic lupus erythematosus – correlations with disease activity and nailfold capillaroscopy changes. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 56, n. 3, p. 1011–1016, 2015.

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

BAUER, J.W.; BAECHLER, E.C.; PETRI, M.; BATLIWALLA, F.M.; CRAWFORD, D.; ORTMANN, W.A.; ESPE, K.J.; LI, W.; PATEL, D.D.; GREGERSEN, P.K.; BEHRENS, T.W. Elevated serum levels of interferon-regulated chemokines are biomarkers for active human systemic lupus erythematosus. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 12, p. 2274–2284, 2006.

BAUER, J.W.; PETRI, M.; BATLIWALLA, F.M.; KOEUTH, T.; WILSON, J.; SLATTERY, C.; PANOSKALTSIS-MORTARI, A.; GREGERSEN, P.K.; BEHRENS, T.W.; BAECHLER, E.C. Interferon-regulated chemokines as biomarkers of systemic lupus erythematosus disease activity: a validation study. **Arthritis and rheumatism**, v. 60, n. 10, p. 3098–3107, 2009.

BERTHOUD, T.K.; DUNACHIE, S.J.; TODRYK, S.; HILL, A.V.S.; FLETCHER, H.A. MIG (CXCL9) is a more sensitive measure than IFN- γ of vaccine induced T-cell responses in volunteers receiving investigated malaria vaccines. **Journal of Immunological Methods**, v. 340, n. 1, p. 33–41, 2009.

BERTHOUD, T.K.; MANACA, M.N.; QUELHAS, D.; AGUILAR, R.; GUINOVART, C.; PUYOL, L.; BARBOSA, A.; ALONSO, P.L.; DOBAÑO, C. Comparison of commercial kits to measure cytokine responses to *Plasmodium falciparum* by multiplex microsphere suspension array technology. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 115, 2011.

BERTSIAS, G.K.; CERVERA, R.; BOUMPAS, D.T. Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis and Clinical Features. **Eular On-line Course on Rheumatic Diseases**, n. 1909, p. 476–505, 2012.

BIRMINGHAM, D.J.; IRSHAID, F.; NAGARAJA, H.N.; ZOU, X.; TSAO, B.P.; WU, H.; HEBERT, L.A.; ROVIN, B.H. The complex nature of serum C3 and C4 as biomarkers of lupus renal flare. **Lupus**, v. 19, n. 11, p. 1272-1280, 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.L.; BONFÁ, E.; SATO, E.I. Consenso de Lúpus Eritematoso Sistêmico Consensus of Systemic Lupus Erythematosus. **Rev Bras Reumatol**, v. 55, n. 1, p. 196–207, 2008.

CARLI, L.; TANI, C.; VAGNANI, S.; SIGNORINI, V.; MOSCA, M. Leukopenia, lymphopenia, and neutropenia in systemic lupus erythematosus: prevalence and clinical impact – a systemic literature review. **Seminars in arthritis and rheumatism**, v. 45, n. 2, p. 190-194, 2015.

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.

CASTILLO, L.; MACCALLUM, D.M. Cytokine measurement using cytometric bead arrays. **Methods Mol Biol.**, v. 845, p. 425–434, 2012.

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.

COJOCARU, M.; COJOCARU, I.M.; SILOSI, I.; VRABIE, C.D. Manifestations of systemic lupus erythematosus. **Mædica**, v. 6, n. 4, p. 330–336, 2011.

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

CUNHA, J.S.; GILEK-SEIBERT, K. Systemic Lupus Erythematosus: A Review of the Clinical Approach to Diagnosis and Update on Current Targeted Therapies. **Rhode Island Medical Journal**, v. 99, n. 12, p. 23–27, 2016.

DAPUNT, U.; MAURER, S.; GIESE, T.; GAIDA, M.M.; HÄNSCH, G.M. The Macrophage Inflammatory Proteins MIP1 α (CCL3) and MIP2 α (CXCL2) in implant-associated osteomyelitis: Linking inflammation to bone degradation. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, n. 728619; p. 1-10, 2014.

DANTAS, A.T.; ALMEIDA, A.R.; SAMPAIO, M.C.P.D.; CORDEIRO, M.F.; ROCHA JR.; L.F.; DE OLIVEIRA, P.S.S.; PEREIRA, M.C.; REGO, M.J.B.M.; MARQUES, C.D.L.; PITTA, I.R.; DUARTE, A.L.B.P.; PITTA, M.G.R. Corticosteroid inhibits chemokines production in systemic sclerosis patients. **Steroids**, v. 127, n. 1; p. 24-30, 2017.

DAVIS, L. S.; HUTCHESON, J.; MOHAN, C. The Role of Cytokines in the Pathogenesis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 31, n. 10, p. 781–789, 2011.

DENG, Y.; TSAO, B.P. Advances in lupus genetics and epigenetics. **Curr Opin Rheumatol.**, v. 26, n. 5, p. 482–492, 2014.

DESHMANE, S.L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B.E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 29, n. 6, p. 313–326, 2009.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 491, p. 1–13, 2014.

ELSAADANY, H. M.; AFIFI, I. K.; SELIEM, M. RANTES as a predictor for rheumatoid arthritis susceptibility and activity in Egyptians. **Egyptian Rheumatologist**, v. 33, n. 2, p. 85–

91, 2011.

ELSHAL, M.F.; MCCOY, J P. Multiplex bead array assays: Performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. **Methods**, v. 38, n. 4, p. 317–323, 2006.

FAÉ, K.C.; PALACIOS, S.A.; NOGUEIRA, L.G.; OSHIRO, S.E.; DEMARCHI, L.M.F.; BILATE, A.M.B.; POMERANTZEFF, P.M.A.; BRANDÃO, C.; THOMAZ, P.G.; DOS REIS, M.; SAMPAIO, R.; TANAKA, A.C.; CUNHA-NETO, E.; KALIL, J.; GUILHERME, L. CXCL9/mig mediates T cells recruitment to valvular tissue lesions of chronic rheumatic heart disease patients. **Inflammation**, v. 36, n. 4, p. 800–811, 2013.

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

FELIERS, D. Vascular endothelial growth factor as a prognostic marker of lupus nephritis. **Kidney International**, v. 75, n. 12, p. 1251–1253, 2009.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 581–611, 2004.

FERREIRA, G.A.; TEIXEIRA, A.L.; SATO, E.I. Atorvastatin therapy reduces interferon-regulated chemokine CXCL9 plasma levels in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 19, n.8, p. 927–934, 2010.

FLAMMER, J.R.; DOBROVOLNA, J.; KENNEDY, M.A.; CHINENOV, Y.; GLASS, C.K.; IVASHKIV, L.B.; ROGATSKY, I. The type I interferon signaling pathway is a target for glucocorticoid inhibition. **Molecular and cellular biology**, v. 30, n. 19, p. 4564–4574, 2010.

FORTUNA, G.; BRENNAN, M.T. Systemic lupus erythematosus. Epidemiology, pathophysiology, manifestations, and management. **Dental Clinics of North America**, v. 57, n. 4, p. 631–655, 2013.

FRAGOSO-LOYO, H.; ATISHA-FREGOSO, Y.; LLORENTE, L.; SÁNCHEZ-GUERRERO, J. Inflammatory profile in cerebrospinal fluid of patients with headache as a manifestation of neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. **Rheumatology (Oxford)**, v. 52, n. 12, p. 2218–2222, 2013.

FRIERI, M. Accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus: Role of

proinflammatory cytokines and therapeutic approaches. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 12, n. 1, p. 25–32, 2012.

FU, Q.; CHEN, X.; CUI, H.; GUO, Y.; CHEN, J.; SHEN, N.; BAO, C. Association of elevated transcript levels of interferon-inducible chemokines with disease activity and organ damage in systemic lupus erythematosus patients. **Arthritis Research and Therapy**, v. 10, n. 5, p. 1–10, 2008.

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.

GAMBICHLER, T.; SKRYGAN, M.; LABANSKI, A.A.; KOLIOS, A.G.; ALTMAYER, P.; KREUTER, A. Significantly increased CCL5/RANTES and CCR7 mRNA levels in localized scleroderma. **Regulatory Peptides**, v. 170, n. 1–3, p. 4–6, 2011.

GANDINO, I.J.; SCOLNIK, M.; BERTILLER, E.; SCAGLIONI, V.; CATOGGIO, L.J.; SORIANO, E.R. Complement levels and risk of organ involvement in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus science & medicine**, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2017.

GONZÁLEZ, L.A.; TOLOZA, S.M.; MCGWIN JR, G.; ALARCÓN, G.S. Ethnicity in systemic lupus erythematosus (SLE): its influence on susceptibility and outcomes. **Lupus**, v. 22, n. 12, p. 1214–1224, 2013.

GOTTSCHALK, T.A.; TSANTIKOS, E.; HIBBS, M.L. Pathogenic inflammation and its therapeutic targeting in systemic lupus erythematosus. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 28, p. 1–14, 2015.

GUAN, J.; WANG, G.; TAM, L.S.; KWAN, B.C.; LI, E.K.; CHOW, K.M.; LI, P.K.; SZETO, C.C. Urinary sediment ICAM-1 level in lupus nephritis. **Lupus**, v.21, n. 11, p. 1190–1195, 2012.

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. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 70, p. 2029-2036, 2011.

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

HOLCOMBE, R.F.; BAETHGE, B.A.; WOLF, R.E.; BETZING, K.W.; STEWART, R.M.; HALL, V.C.; FUKUDA, M. Correlation of serum interleukin-8 and cell surface lysosome-associated membrane protein expression with clinical disease activity in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 3, n. 2, p. 97-102, 1994.

HOLDSWORTH, S.R.; GAN, P. Cytokines: Names and numbers you should care about. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 12, p. 2243–2254, 2015.

HRYCEK, E.; FRANEK, A.; BŁASZCZAK, E.; DWORAK, J.; HRYCEK A. Serum levels of selected chemokines in systemic lupus erythematosus patients. **Rheumatology international**, v. 33, n. 9, p. 2423-2427, 2013.

HU, X.; WAI-PING, L.; MENG, C.; IVASHKIV, L.B. Inhibition of IFN- γ signaling glucocorticoids. **The journal of immunology**, v. 170, n. 9, p. 4833-4839, 2003.

IBRAHIM, S.; VAN DEN ENGH, G. Flow Cytometry and Cell Sorting. **Cell Separation**, v. 106, n. August, p. 19–39, 2007.

IGHE, A.; DAHLSTRÖM, Ö.; SKOGH, T.; SJÖWALL, C. Application of the 2012 Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria to patients in a regional Swedish systemic lupus erythematosus register. **Arthritis Research & Therapy**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2015.

JAMES, J.A.; ROBERTSON, J.M. Lupus and Epstein-Barr. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 24, n. 4, p. 383–388, 2012.

JUNE, R.R.; AGGARWAL, R. The use and abuse of diagnostic/classification criteria. **Best practice & research Clinical Rheumatology**, v. 28, n. 6, p. 921-934, 2014.

KANEKO, H.; OGASAWARA, H.; NAITO, T.; AKIMOTO, H.; LEE, S.; HISHIKAWA, T.; SEKIGAWA, I.; TOKANO, Y.; TAKASAKI, Y.; HIROSE, S.I.; HASHIMOTO, H. Circulating levels of beta-chemokines in systemic lupus erythematosus. **The Journal of Rheumatology**, v. 26, n. 3, p. 568-73, 1999.

KARONITSCH, T.; FEIERL, E.; STEINER, C.W.; DALWIGK, K.; KORB, A.; BINDER, N.; RAPP, A.; STEINER, G.; SCHEINECKER, C. Activation of the interferon- γ signaling pathway in systemic lupus erythematosus peripheral blood mononuclear cells. **Arthritis & Rheumatism**, v. 60, n. 5, p. 1463-1471, 2009.

KAUL, A.; GORDON, C.; CROW, M.K.; TOUMA, Z.; UROWITZ, M.B.; VAN VOLLENHOVEN, R.; RUIZ-IRASTORZA, G.; HUGHES, G. Systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. June, p. 1–22, 2016.

KIM, H.; JUNG, J.; SUH, C.. Biomarkers for systemic lupus erythematosus: an update. **International Journal of Clinical Rheumatology**, v.10, n. 3, p. 195–204, 2015.

KOJURI, J.; NAZARINIA, M.A.; GHAHARTARS, M.; MAHMOODY, Y.; REZAIAN, G.R.; LIAGHAT, L. QT dispersion in patients with systemic lupus erythematosus: the impact of disease activity. **BMC cardiovascular disorders**, v. 12, n. 11, p. 1-5, 2012.

KONG, K. O.; TAN, A.W.; THONG, B.Y.; LIAN, Y.K.; CHENG, Y.K.; THE, C.L.; KOH, E.T.; CHNG, H.H.; LAW, W.G.; LAU, T.C.; LEONG, K.P.; LEUNG, B.P.; HOWE, H.S. Enhanced expression of interferon-inducible protein-10 correlates with disease activity and clinical manifestations in systemic lupus erythematosus. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 156, n. 1, p. 134–140, 2009.

KRENSKY, A.M.; AHN, Y.T. Mechanisms of disease: Regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 3, n. 3, p. 164–170, 2007.

KUHN, A.; BONSMANN, G.; ANDERS, H.J.; HERZER, P.; TENBROCK, K.; SCHNEIDER, M. Diagnostik und Therapie des systemischen Lupus erythematosides. **Dtsch Ärztebl Int**, v. 112, p. 423–32, 2015.

LALANI, S.; POPE, J.; LEON, F.; PESCHKEN, C.; Members of CaNIOS/1000 Faces of Lupus. Clinical features and prognosis of late-onset systemic lupus erythematosus: results from the 1000 faces of lupus study. **The journal of rheumatology**, v. 37, n. 1, p. 38–44, 2010.

LAM, G.K.W.; PETRI, M. Assessment of systemic lupus erythematosus. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 23, n. 5 Suppl 39, p. S120–S132, 2005.

LAWSON, C.; WOLF, S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 1, p. 22–32, 2009.

- LEE, Y.H.; SONG, G.G. Urinary MCP-1 as a biomarker for lupus nephritis: a meta-analysis. **Zeitschrift für Rheumatologie**, v. 76, n. 4, p. 357–363, 2017.
- LEE, Y.J.; SCOFIELD, R.H.; HYON, J.Y.; YUN, P.Y.; LEE, H.J.; LEE, E.Y.; LEE, E.B.; SONG, Y.W. Salivary chemokine levels in patients with primary Sjogren's syndrome. **Rheumatology**, v. 49, n. 9, p. 1747-1752, 2010.
- LENG, S.X.; MACELHANEY, J.E.; WALSTON, J.D.; XIE, D.; FEDARKO, N.S.; KUCHEL, G.A. ELISA and Multiplex Technologies for Cytokine Measurement in Inflammation and Aging Research. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 63, n. 8, p. 879–884, 2008.
- LEVY, D.M.; KAMPHUIS, S. Systemic lupus erythematosus in children and adolescents. **Pediatrics in Review**, v. 59, n. 2, p. 345–364, 2012.
- LI, W.; LI, H.; SONG, W.; HU, Y.; LIU, Y.; DA, R.; CHEN, X.; LI, Y.; LING, H.; ZHONG, Z.; ZHANG, F. Differential diagnosis of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis with complements C3 and C4 and C-reactive protein. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 6, n. 5, p. 1271-1276, 2013.
- LI, Y.; FANG, X.; LI, Q.Z. Biomarker Profiling for Lupus Nephritis. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 11, n. 3, p. 158–165, 2013.
- LISNEVSKAIA, L.; MURPHY, G.; ISENBERG, D. Systemic lupus erythematosus. **Lancet**, v. 384, n. 9957, p. 1878-1888, 2014.
- LIT, L.C.W.; WONG, C.K.; TAM, L.S.; LI, E.K.M.; LAM, C.W.K. Raised plasma concentration and ex vivo production of inflammatory chemokines in patients with systemic lupus erythematosus. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 65, n. 2, p. 209–215, 2006.
- LIU, C.; KAO, A.H.; MANZI, S.; AHEARN, J.M. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. **Therapeutic advances in musculoskeletal disease**, v. 5, n. 4, p. 210–233, 2013.
- LIU, C.C.; AHEARN, J.M. The search for lupus biomarkers. **Best Practice and Research: Clinical Rheumatology**, v. 23, n. 4, p. 507–523, 2009.
- LIU, L.; XU, G.; DOU, H.; DENG, G.M. The features of skin inflammation induced by lupus serum. **Clinical Immunology**, v. 165, p. 4–11, 2016.

LIU, M.; GUO, S.; HIBBERT, J.M.; JAIN, V.; SINGH, N.; WILSON, N.O.; STILES, J.K. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 3, p. 121–130, 2011.

LONG, E.O. ICAM-1: Getting a Grip on Leukocyte Adhesion. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 9, p. 5021–5023, 2011.

LONG, H.; YIN, H.; WANG, L.; GERSHWIN, M.E.; LU, Q. The critical role of epigenetics in systemic lupus erythematosus and autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 74, p. 118–138, 2016.

LU, C.; NOSSENT, J. Thrombopoietin levels in systemic lupus erythematosus are linked to inflammatory cytokines, but unrelated to thrombocytopenia or thrombosis. **Lupus**, v. 24, n. 1, p. 18–24, 2015.

LU, M.M.; WANG, J.; PAN, H.F.; CHEN, G.M.; LI, J.; CEN, H.; FENG, C.C.; YE, D.Q. Increased serum RANTES in patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology international**, v. 32, n. 5, p. 1231–1233, 2012.

MAIDHOF, W.; HILAS, O. Lupus: an overview of the disease and management options. **P & T : a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 37, n. 4, p. 240–249, 2012.

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

MAURER, M.; VON STEBUT, E. Macrophage inflammatory protein-1. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 10, p. 1882–1886, 2004.

MENTEN, P.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J. Macrophage inflammatory protein-1. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.13. n. 1, p: 455 – 481, 2002.

MERAYO-CHALICO, J.; BARRERA-VARGAS, A.; JUÁREZ-VEGA, G.; ALCOCER-VARELA, J.; ARAUZ, A.; GÓMEZ-MARTÍN, D. Differential serum cytokine profile in patients with systemic lupus erythematosus and posterior reversible encephalopathy syndrome. **Clinical and experimental immunology**, v. 192, n. 1, p. 1-15, 2017.

MIAO, J.; ZHANG, K.; LV, M.; LI, Q.; ZHENG, Z.; HAN, Q.; GUO, N.; FAN, C.; ZHU, P. Circulating Th17 and Th1 cells expressing CD161 are associated with disease activity in

- rheumatoid arthritis. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 43, n. 3, p. 194–201, 2014.
- 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 & 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.
- MIOT, H. A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 10, n. 4, p. 275–278, 2011.
- MIRABELLI, G.; CANNARILE, F.; BRUNI, C.; VAGELLI, R.; DE LUCA, R.; CARLI, L. One year in review 2015: Systemic lupus erythematosus. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 33, n. 3, p. 414–425, 2015.
- MISCHAK, H.; ALLMAIER, G.; APWEILER, R.; ATTWOOD, T.; BAUMANN, M.; BENIGNI, A.; BENNETT, S.E.; BISCHOFF, R.; BONGCAM-RUDLOFF, E.; CAPASSO, G.; COON, J.J.; D'HAESE, P.; DOMINICZAK, A.F.; DAKNA, M.; DIHAZI, H.; EHRICH, J. H.; FERNANDEZ-LLAMA, P.; FLISER, D.; FROKIAER, J.; GARIN, J.; GIROLAMI, M.; HANCOCK, W.S.; HAUBITZ, M.; HOCHSTRASSER, D.; HOLMAN, R.R.; IOANNIDIS, J.P.A.; JANKOWSKI, J.; JULIAN, B.A.; KLEIN, J.B.; KOLCH, W.; LUIDER, T.; MASSY, Z.; MATTES, W.B.; MOLINA, F.; MONSARRAT, B.; NOVAK, J.; PETER, K.; ROSSING, P.; SANCHEZ-CARBAYO, M.; SCHANSTRA, J.P.; SEMMES, O.J.; SPASOVSKI, G.; THEODORESCU, D.; THONGBOONKERD, V.; VANHOLDER, R.; VEENSTRA, T.D.; WEISSINGER, E.; YAMAMOTO, T.; VLAHOU, A. Recommendations for Biomarker Identification and Qualification in Clinical Proteomics. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 46, p. 1–6, 2010.
- MOK, C. C. Biomarkers for lupus nephritis: A critical appraisal. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, 2010.
- MOK, C.C. Epidemiology and survival of systemic lupus erythematosus in Hong Kong Chinese. **Lupus**, v. 20, n. 7, p. 767-771, 2011.
- MOREIRA, I.S.; FERNANDES, P.A.; RAMOS, M.J. Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition – A critical review. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 2, p. 223–245, 2007.

MORGAN, E.; VARRO, R.; SEPULVEDA, H.; EMBER, J.A.; APGAR, J.; WILSON, J.; LOWE, L.; CHEN, R.; SHIVRAJ, L.; AGADIR, A.; CAMPOS, R.; ERNST, D.; GAUR, A. Cytometric bead array: A multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. **Clinical Immunology**, v. 110, n. 3, p. 252–266, 2004.

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.; DA SILVA, J.F.M.; FIORENTINO, G.R.; DOS SANTOS, A.B.S.; LEITE, M.F.S.; NOGUEIRA, M.A.; MENOLLI, P.V.S.; MENOLLI, R.A. Incidence and clinical-laboratory aspects of systemic lupus erythematosus in a southern Brazilian city. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n.3, p. 231–239, 2011.

NARUMI, S.; KABURAKI, T.; YONEYAMA, H.; IWAMURA, H.; KOBAYASHI, Y.; MATSUSHIMA, K. Neutralization of IFN-inducible protein 10/CXCL10 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 6, p. 1784-91, 2002.

NICOLAOU, O.; KOUSIOS, A.; HADJISVVAS, A.; LAUWERYS, B.; SOKRATOUS, K.; KYRIACOU, K. Biomarkers of systemic lupus erythematosus identified using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 21, n. 5, p. 993–1012, 2017.

NIELEPKOWICZ-GOŹDZIŃSKA, A.; FENDLER, W.; ROBAK, E.; KULCZYCKA-SIENNICKA, L.; GÓRSKI, P.; PIETRAS, T.; BRZEZIAŃSKA, E.; ANTCZAK, A. Exhaled IL-8 in systemic lupus erythematosus with and without pulmonary fibrosis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 62, n. 3, p. 231–238, 2014.

NIEWOLD, T.B. Interferon Alpha as a Primary Pathogenic Factor in Human Lupus. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 31, n. 12, p. 887–892, 2011.

NTATSAKI, E.; ISENBERG, D. Risk factors for renal disease in systemic lupus erythematosus and their clinical implications. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 11, n. 7, p. 837–848, 2015.

O'DONNELL, E.; ERNST, D.N.; HINGORANI, R. Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis. **Immune Network**, v. 13, n. 2, p. 43–54, 2013.

O'NEILL, S.; CERVERA, R. Systemic lupus erythematosus. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 24, p. 841–855, 2010.

ODLER, B.; BIKOV, A.; STREIZIG, J.; BALOGH, C.; KISS, E.; VINCZE, K.; BARTA, I.; HORVÁTH, I.; MÜLLER, V. CCL21 and IP-10 as blood biomarkers for pulmonary involvement in systemic lupus erythematosus patients. **Lupus**, v. 26, n. 6, p. 572–579, 2016.

OHL, K.; TENBROCK, K. Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, n. 2011, p. 1–14, 2011.

OKAMOTO, H.; KOBAYASHI, A.; YAMANAKA, H. Cytokines and chemokines in neuropsychiatric syndromes of systemic lupus erythematosus. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, n. 2010, p. 1–8, 2010.

OLNES, M.J.; KOTLIAROV, Y.; BIANCOTTO, A.; CHEUNG, F.; CHEN, J.; SHI, R.; ZHOU, H.; WANG, E.; TSANG, J.S.; NUSSENBLATT, R. Effects of systemically administered hydrocortisone on the human immunome. **Scientific reports**, v. 6, p. 23002, 2016.

PACHECO, Y.; BARAHONA-CORREA, J.; MONSALVE, D.M.; ACOSTA-AMPUDIA, Y.; ROJAS, M.; RODRÍGUEZ, Y.; SAAVEDRA, J.; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, M.; MANTILLA, R.D.; RAMÍREZ-SANTANA, C.; MOLANO-GONZÁLEZ, N.; ANAYA, JM. Cytokine and autoantibody clusters interaction in systemic lupus erythematosus. **Journal translational medicine.**, v. 25, n. 1, p. 215-239, 2017.

PARKS, C.G.; DE SOUZA, A.E.S.; 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. 1–6, 2010.

PETRACKOVA, A.; SMRZOVA, A.; GAJDOS, P.; SCHUBERTOVA, M.; SCHNEIDEROVA, P.; KROMER, P.; SNASEL, V.; SKACELOVA, M.; MRAZEK, F.; ZADRAZIL, J.; HORAK, P.; KRIEGOVA, E. Serum protein pattern associated with organ damage and lupus nephritis in systemic lupus erythematosus revealed by PEA immunoassay. **Clin. Proteomics**, v. 14, n. 32, p. 1-15, 2017.

PETRI, M.; ORBAI, A. M.; ALARCÓN, 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.; SÁNCHEZ-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.; STOLL, 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.

PICOT, J. GUERIN, C.L.; LE VAN KIM, C.; BOULANGER, C.M. Flow cytometry: Retrospective, fundamentals and recent instrumentation. **Cytotechnology**, v. 64, n. 2, p. 109–130, 2012.

PINNA, S.; PASELLA, S.; DEIANA, M.; BARALLA, A.; MANNU, A.; MASALA, A. G. E.; PILERI, P. V.; DEIANA, N.; SCOGNAMILLO, F.; PALA, C.; ZINELLU, A.; CARRU, C.; DEIANA, L. Proteomic analysis of human plasma and peripheral blood mononuclear cells in Systemic Lupus Erythematosus patients. **Journal of Immunological Methods**, v. 446, p. 37–46, 2017.

POSTAL, M.; PELIÇARI, K.O.; SINICATO, N.A.; MARINI, R.; COSTALLAT, L.T.; APPENZELLER, S.; . Th1/Th2 cytokine profile in childhood-onset systemic lupus erythematosus. **Cytokine**, v. 61, n. 3, p. 785–791, 2013.

PRADO, C.; DE PAZ, B.; GÓMEZ, J.; LÓPEZ, P.; RODRÍGUEZ-CARRIO, J.; SUÁREZ, A. Glucocorticoids enhance Th17/Th1 imbalance and signal transducer and activator of transcription 3 expression in systemic lupus erythematosus patients. **Rheumatology (Oxford)**, v. 50, n. 10, p. 1794-1801, 2011.

RABQUER, B.J.; TSOU, P.S.; HOU, Y.; THIRUNAVUKKARASU, E.; HEINES 3rd, G.K.; IMPENS, A.J.; PHILLIPS, K.; KAHALEH, B.; SEIBOLD, J.R.; KOCH, A.E. Dysregulated

expression of MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10 and CXCL16 and their receptors in systemic sclerosis. **Arthritis research & therapy**, v. 13, n. 1, p. 13-18, 2011.

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.

RODRÍGUEZ-CARRIO, J.; DE PAZ, B.; LÓPEZ, P.; PRADO, C.; ALPERI-LÓPEZ, M.; BALLINA-GARCÍA, J.; SUÁREZ. IFN α serum levels are associated with endothelial progenitor cells imbalance and disease features in rheumatoid arthritis patients. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86069, 2014.

RÖNNBLM, L.; ELKON, K.B. Cytokines as therapeutic targets in SLE. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 6, p. 339–347, 2010.

ROSE, T.; GRÜTZKAU, A.; KLOTSCH, J.; ENGHARD, P.; FLECHSIG, A.; KELLER, J.; RIEMEKASTEN, G.; RADBRUCH, A.; BURMESTER, G.R.; DÖRNER, T.; HIEPE, F.; BIESEN, R. Are interferon-related biomarkers advantageous for monitoring disease activity in systemic lupus erythematosus? A longitudinal benchmark study. **Rheumatology (Oxford)**, v. 56, n. 9, p. 1618-1626, 2017.

ROVIN, B.H.; LU, L.; ZHANG, X. A novel interleukin-8 polymorphism is associated with severe systemic lupus erythematosus nephritis. **Kidney International**, v. 62, n. 1, p.261-5, 2002.

RUSSO, R.C.; GARCIA, C.C.; TEIXEIRA, M.M.; AMARAL, F.A.; The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. **Expert review of clinical immunology**, v. 10, n. 5, p. 593-619, 2014.

SABRY, A.; SHEASHAA, H.; EL-HUSSEINI, A.; EL-DAHSHAN, K.; ABDEL-RAHIM, M.; ELBASYOUNI, S.R. Intercellular adhesion molecules in systemic lupus erythematosus patients with lupus nephritis. **Clinical Rheumatology**, v. 26, n. 11, p. 1819–1823, 2007.

SAMOCHOCKI, Z.; BOGACZEWICZ, J.; SYSA-JEDRZEJOWSKA, A.; MCCAULIFFE, D.P.; KONTNY, E.; WOZNIACKA, A. Expression of vascular endothelial growth factor and other cytokines in atopic dermatitis, and correlation with clinical features. **International Journal of Dermatology**, v. 55, n. 3, p. 141–146, 2016.

SARZI-PUTTINI, P.; ATZENI, F.; LACCARINO, L.; DORIA, A. Environment and systemic lupus erythematosus: An overview. **Autoimmunity**, v. 38, n. 7, p. 465–472, 2005.

SCHNEIDER, L.; DA SILVA, A.C.C.; WERRES JUNIOR, L.C.; ALEGRETTI, A.P.; DOS SANTOS, A.S.P.; SANTOS, M.; SASSI, R.; HEEMANN, B.; PFAFFENSELLER, B.; BRENOL, J.C.T.; MONTICIELO, O.A. Vitamin D and cytokine profiles in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v.24, n. 11, p. 1191–1197, 2015.

SENNA, E.R.; DE BARROS, A.L.P.; SILVA, E.O.; COSTA, I.F.; PEREIRA, L.V.B.; CICONELLI, R.M.; FERRAZ, M.B. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **The journal of Rheumatology**, v. 31, n. 3, p. 594–597, 2004.

SHAHZAD, A.; KNAPP, M.; LANG, I.; KÖHLER, G. Interleukin 8 (IL-8) - a universal biomarker?. **International Archives of Medicine**, v. 3, n. 11, p. 11, 2010.

SHEN, Y.; PAŠA-TOLIĆ, L.; ROBINSON, E.W.; ADKINS, J.N.; SMITH, R.D. New challenges for proteomics technologies: a mini perspective review. **A Proteomics**, v. 1, n. 1, p. 1–3, 2014.

SHIBUYA, M. Vegf-vegfr signals in health and disease. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 22, n. 1, p. 1–9, 2014.

STRIMBU, K.; TAVEL, J.A. What are Biomarkers?. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463–466, 2011.

SUBEDI, A.; MAGDER, L.S.; PETRI, M. Effect of mycophenolate mofetil on the white blood cell count and the frequency of infections in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v. 35, n. 10, p. 1687–1692, 2015.

SUCUR, A.; JAJIC, Z.; ARTUKOVIC, M.; MATIJASEVIC, M.I.; ANIC, B.; FLEGAR, D.; MARKOTIC, A.; KELAVA, T.; IVCEVIC, S.; KOVACIC, N.; KATAVIC, V.; GRCEVIC, D. Chemokine signals are crucial for enhanced homing and differentiation of circulating osteoclast progenitor cells. **Arthritis research & therapy**, v. 19, n. 1; p. 142-158, 2017.

TAHARA, T.; SHIBATA, T.; YAMASHITA, H.; HIRATA, I.; ARISAWA, T. The Role of RANTES Promoter Polymorphism in Functional Dyspepsia. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 45, n. 2, p. 235–240, 2009.

TAHERNIA, L.; NAMAZI, S.; REZAEI, N.; ZIAEE, V. Cytokines in systemic lupus

erythematosus: their role in pathogenesis of disease and possible therapeutic opportunities. **Rheumatology Research**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 2017.

TAN, E.M.; COHEN, A.S.; FRIES, J.F.; MASI, A.T.; MCSHANE, D.J.; ROTHFIELD, N.F.; SCHALLER, J.G.; TALAL, N.; WINCHESTER, R. J. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 25, n. 11, p. 1271–1277, 1982.

TIAN, S.; LI, J.; WANG, L.; LIU, H.; CHENG, G.; LIU, D.; DENG, Y.; GOU, R.; WAN, Y.; JIA, J.; CHEN, C. Urinary levels of RANTES and M-CSF are predictors of lupus nephritis flare. **Inflammation Research**, v. 56, n. 7, p. 304–310, 2007.

TORRES, A.; ASKARI, A.D.; MALEMUD, C.J. Cardiovascular disease complications in systemic lupus erythematosus. **Biomarkers in Medicine**, v. 3, n. 3, p. 239–252, 2009.

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

TRIPP, N.H.; TARN, J.; NATASARI, A.; GILLESPIE, C.; MITCHELL, S.; HACKETT, K.L.; BOWMAN, S.J.; PRICE, E.; PEASE, C.T.; EMERY, P.; LANYON, P.; HUNTER, J.; GUPTA, M.; BOMBARDIERI, M.; SUTCLIFFE, N.; PITZALIS, C.; McLAREN, J.; COOPER, A.; REGAN, M.; GILES, I.; ISENBERG, D.A.; SARAVANAN, V.; COADY, D.; DASGUPTA, B.; McHUGH, N.; YOUNG-MIN, S.; MOOTS, R.; GENDI, N.; AKIL, M.; GRIFFITHS, B.; LENDREM, D.W.; NG, W.F. Fatigue in primary Sjogren's syndrome is associated with lower levels of proinflammatory cytokines. **Rheumatic & musculoskeletal diseases**, v. 2, n. 2, p. 000282, 2016.

TURNER, M.D.; NEDJAI, B.; HURST, T.; PENNINGTON, D.J.. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, 2014.

UVA, L.; MIGUEL, D.; PINHEIRO, C.; FREITAS, J.P.; GOMES, M.M.; FILIPE, P. Cutaneous manifestations of systemic lupus erythematosus. **Autoimmune Diseases**, v. 1, n. 1, p. 1–15, 2012.

VEGA, L.; BARBADO, J.; ALMANSA, R.; GONZÁLEZ-GALLEGO, R.; RICO, L.; JIMENO, A.; NOCITO, M.; DE LEJARAZU, R.O.; BERMEJO-MARTIN, J.F. Prolonged

standard treatment for systemic lupus erythematosus fails to normalize the secretion of innate immunity-related chemokines. **European cytokine network**, v. 21, n. 1, p. 71-76, 2010.

VILÁ, L.M.; MOLINA, M.J.; MAYOR, A.M.; CRUZ, J.J.; RÍOS-OLIVARES, E.; RÍOS, Z. Association of serum MIP-1 α , MIP-1 β , and RANTES with clinical manifestations, disease activity, and damage accrual in systemic lupus erythematosus. **Clinical Rheumatology**, v. 26, n. 5, p. 718–722, 2007.

VILAR, M.J.P.; RODRIGUES, J.M.; SATO, E.I. Incidência de lúpus eritematoso sistêmico em Natal, RN - Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 6, p. 347–351, 2003.

WASEF, S.Z.Y. Gender differences in systemic lupus erythematosus. **Gender Medicine**, v. 1, n. 1, p. 12-17, 2004.

WECKERLE, C.E.; NIEWOLD, T.B. The unexplained female predominance of systemic lupus erythematosus: clues from genetic and cytokine studies. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 40, n. 1, p. 42-49, 2011.

XIE, H.F.; LI, J.; SHI, W. Effect of corticosteroids on balance of Th cytokines in patients with systemic lupus erythematosus. **Bulletin of human medical university**, v. 27, n. 6, p. 533-535, 2002. [abstract]

YAP, D.Y.H.; LAI, K.N. Cytokines and their roles in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: From basics to recent advances. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1–10, 2010.

YAP, D.Y.H.; LAI, K.N. Pathogenesis of renal disease in Systemic Lupus Erythematosus - the role of autoantibodies and lymphocytes subset abnormalities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 7917–7931, 2015.

YAP, D.Y.H.; LAI, K.N. The role of cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus - From bench to bedside. **Nephrology**, v. 18, n. 4, p. 243–255, 2013.

YIP J.; AGHDASSI, E.; SU, J.; LOU, W.; REICH, H.; BARGMAN, J.; SCHOLEY, J.; GLADMAN, D.D.; UROWITZ, M.B.; FORTIN, P.R. Serum albumin as a marker for disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. **The journal of rheumatology**, v. 37, n. 8, p. 1667-1672, 2010.

YOSHIO, T.; OKAMOTO, H.; KURASAWA, K.; DEI, Y.; HIROHATA, S.; MINOTA, S. IL-

6, IL-8, IP-10, MCP-1 and G-CSF are significantly increased in cerebrospinal fluid but not in sera of patients with central neuropsychiatric lupus erythematosus. **Lupus**, v. 25, n. 9, p. 997–1003, 2016.

YU, C.; GERSHWIN, M.E.; CHANG, C. Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: a critical review. **Journal of Autoimmunity**, v. 10, n. 3, p. 48-49, 2014.

ZENG, J.; WU, H.; ZHAO, M.; LU, Q. Novel biomarkers for systemic lupus erythematosus. **Biomarkers in Medicine**, v. 11, n. 8, p. 677–686, 2017.

ZHANG, J.; JIANXIONG, A. Cytokines, inflammation and pain. **Int Anesthesiol Clin.**, v. 45, n. 2, p. 27–37, 2007.

ZHAO, P.W.; JIANG, W.G.; WANG, L.; JIANG, Z.Y.; SHAN, Y.X.; JIANG, Y.F. Plasma levels of IL-37 and correlation with TNF- α , IL-17A, and disease activity during DMARD treatment of rheumatoid arthritis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e95346, 2014.

ZHAO, X.; TANG, Y.; QU, B.; CUI, H.; WANG, S.; WANG, L.; LUO, X.; HUANG, X.; LI, J.; CHEN, S.; SHEN, N. MicroRNA-125a contributes to elevated inflammatory chemokine RANTES levels via targeting KLF13 in systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n. 11, p. 3425-3435, 2010.

ZHOU, L.; LU, G.; SHEN, L.; WANG, L.; WANG, M. Serum Levels of Three Angiogenic Factors in Systemic Lupus Erythematosus and Their Clinical Significance. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–6, 2014.

ZUBAIR, A.; FRIERI, M. Lupus nephritis: Review of the LITERATURE. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 13, n. 6, p. 580–586, 2013.

ANEXOS

ANEXO A – Critérios do American College of Rheumatology (ACR) para diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistêmico

Critérios	Definição
1. Erupção malar	Eritema constante, plano ou elevado, sobre as eminências malares, tendendo para os sulcos nasolabiais.
2. Erupção discóide	Aumento de manchas eritematosas com descamação queratoide e tamponamento folicular; cicatrizes atróficas podem ocorrer em lesões mais antigas.
3. Fotossensibilidade	Erupção cutânea por reação anormal à exposição à luz solar, seja por relato do paciente ou observação médica.
4. Úlcera oral	Ulceração oral ou nasofaríngea, geralmente indolor, observada por médico.
5. Artrite	Artrite não erosiva envolvendo duas ou mais articulações periféricas, associada à hipersensibilidade, tumefação e derrame.
6. Serosite	<p>a) Pleurite—convincente histórico de dor pleurítica, ou atrito ouvido pelo médico ou evidência de derrame pleural.</p> <p style="text-align: center;"><i>OU</i></p> <p>b) Pericardite — documentada por ECG, ou atrito ou evidência de derrame pericárdico.</p>
7. Distúrbio renal	<p>a) Proteinúria persistente maior que 0,5g por dia ou maior que 3+ se não for realizada quantificação.</p> <p style="text-align: center;"><i>OU</i></p> <p>b) Cilindros celulares – podendo ser hemático, granular, tubular ou misto.</p>
8. Distúrbio neurológico	<p>a) Convulsões – na ausência de drogas tóxicas ou distúrbios metabólicos conhecidos; ex. uremia, cetoacidose ou desbalanço eletrolítico.</p> <p style="text-align: center;"><i>OU</i></p> <p>b) Psicose—na ausência de drogas tóxicas ou distúrbios metabólicos conhecidos; ex. uremia, cetoacidose ou desbalanço eletrolítico.</p>

9. Distúrbio hematológico	a) Anemia hemolítica—com reticulocitose. <i>OU</i> b) Leucopenia— total menor que 4.000/mm ³ em duas ou mais ocasiões. <i>OU</i> c) Linfopenia— menor que 1.500/mm ³ em duas ou mais ocasiões. <i>OU</i> d) Trombocitopenia—menor que 100.000/mm ³ na ausência de drogas tóxicas.
10. Distúrbios imunológicos	a) Presença de anticorpos anti-fosfolípides. <i>OU</i> b) Anti-DNA: anticorpo anti-DNA nativo em títulos anormais. <i>OU</i> c) Anti-Sm: presença de anticorpos anti-Sm. <i>OU</i> d) Testes sorológicos falso-positivos para sífilis por pelo menos 6 meses e confirmado por FTA-abs negativo.
11. Anticorpo antinuclear	Título anormal de anticorpo antinuclear por imunofluorescência ou teste equivalente em qualquer momento na ausência de drogas que sabidamente estão associadas com o Lúpus induzido.

ANEXO B – Critérios do *Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC)* para o diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico

Critérios clínicos do SLICC	
Critérios	Definição
1. Lúpus cutâneo agudo incluindo erupção malar (não considerar se erupção malar discóide)	Lúpus bolhoso; necrólise epidérmica tóxica variante do lúpus; erupção lúpica maculopapular; erupção lúpica fotossensível (na ausência de dermatomiosite) ou lúpus cutâneo subagudo (lesões psoríaseformes não endurecidas e/ou lesões anulares policíclicas que resolvem sem deixar cicatrizes, embora ocasionalmente com despigmentação pós-inflamatória ou telangiectasias).
2. Lúpus cutâneo crônico incluindo erupção discóide clássica	Lesões localizadas (abaixo do pescoço) e generalizadas (acima e abaixo do pescoço); lúpus hipertrófico (verrucoso); paniculite lúpica (profunda); lúpus mucoso; lúpus eritematoso tímido; frieiras lúpicas; lúpus discóide / líquen plano se sobrepõem.
3. Úlceras orais	Úlceras no palato, boca, língua ou úlcera nasais (na ausência de outras causas como vasculites, infecções (herpes), doença inflamatória do intestino, artrite reativa, e alimentos ácidos).
4. Alopecia não cicatricial	Fragilidade capilar ou queda difusa (na ausência de outras causas, como alopecia areata, drogas, deficiência de ferro e alopecia androgênica alopecia).
5. Sinovite	Envolvendo duas ou mais articulações, caracterizada por edema ou efusão ou sensibilidade em duas ou mais articulações e trinta minutos ou mais de rigidez matinal.
6. Serosite	Pleurisia típica para mais de 1 dia (ou derrames pleurais, ou atrito pleural); dor pericárdica típica (dor com decúbito que melhora ao sentar) por mais de um dia (ou derrame pericárdico, ou atrito pericárdico, ou pericardite pelo ECG) na ausência de outras causas, como infecção, uremia.
7. Distúrbio renal	Proteínas urinárias/creatinina (ou proteinúria de 24h) revelando 500 mg de proteínas/24h OU presença de células vermelhas.
8. Distúrbio neurológico	Convulsões; psicoses; formas múltiplas de mononeurite (na ausência de outras causas, como vasculite primária); vasculite; mielite; neuropatia craniana ou periférica (na ausência de outras causas, como vasculite primária, infecção e diabetes melito); confusão mental aguda (na ausência de outras causas, incluindo metabólitos tóxicos, uremia e drogas).
9. Distúrbio hematológico	Anemia hemolítica.
10. Distúrbio hematológico	Leucopenia (< 4000/mm ³) pelo menos uma vez (na ausência de outras causas conhecidas, como drogas e hipertensão portal) OU Linfopenia (< 1000/mm ³) pelo menos uma vez (na ausência de outras causas conhecidas como corticosteróides, drogas e infecção)
11. Distúrbio hematológico	Trombocitopenia (<100.000/mm ³) pelo menos uma vez (na ausência de outras causas conhecidas como drogas, hipertensão portal e púrpura trombocitopênica trombótica).

Crêterios imunológicos do SLICC	
Crêterios	Defini�o
1. ANA	Anticorpos antinucleares acima do valor de referência laboratorial.
2. Anti-dsDNA	Anti-dsDNA acima da faixa de referência do laboratório, exceto ELISA: duas vezes acima da faixa de referência de laboratório.
3. Anti-Sm	Anti-Sm.
4. Anticorpo antifosfolípides	Qualquer um dos seguintes: anticoagulante lúpico; RPR falsopositivo; médios ou altos títulos de anticardiolipina (IgA, IgG ou IgM); anti-�2 glycoproteina I (IgA, IgG or IgM).
5. Sistema do complemento	Baixos níveis de C3, C4, CH50.
6. Coombs direto	Teste de Coombs direto na ausência de anemia hemolítica.

ANEXO C – Índice de atividade utilizado no LES, SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*)

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

4	<input type="checkbox"/>	Proteinúria	Concentração > a 0,5 g/24 horas.
4	<input type="checkbox"/>	Piúria	Mais de 5 leucócitos/campo na ausência de infecção.
2	<input type="checkbox"/>	Rash cutâneo	Início recente ou recorrente, caráter inflamatório.
2	<input type="checkbox"/>	Alopecia	Início recente ou recorrente, excessiva, difusa ou localizada de perda de cabelo.
2	<input type="checkbox"/>	Úlcera de mucosa	Início recente ou recorrente de úlceras nasais ou orais.
2	<input type="checkbox"/>	Pleurite	Dor pleurítica com atrito, derrame ou espessamento.
2	<input type="checkbox"/>	Pericardite	Dor no peito, com atrito ou derrame pericárdico, confirmado por eletrocardiograma.
2	<input type="checkbox"/>	Complemento baixo	CH50; C3 ou C4 abaixo dos valores de referência.
2	<input type="checkbox"/>	Anti-DNA	Acima dos valores de referência do laboratório.
1	<input type="checkbox"/>	Febre	Temperatura axilar >38°, na ausência de processo
1	<input type="checkbox"/>	Trombocitopenia	Concentração de plaquetas inferior a 100 000/mm ³ (excluídas causas farmacológicas).
1	<input type="checkbox"/>	Leucopenia	Concentração de leucócitos inferior a 3 000/mm ³ (excluídas causas farmacológicas).

_____ Soma total dos pontos

ANEXO D – 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 E – Folha de aprovação do projeto de pesquisa pela Gerência de Ensino e Pesquisa do Hospital das Clínicas - UFMG



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 F – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta de amostras biológicas

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

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

Projeto de pesquisa:

“Lupus eritematoso sistêmico: aspectos hematológicos e imunológicos”

Prezado(a) Senhor(a),

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

As informações obtidas nesta pesquisa poderão não lhe trazer benefícios imediatos, mas poderão trazer benefícios para outros indivíduos com a mesma doença no futuro. Se você quiser participar desta pesquisa, poderá fazê-lo doando uma amostra de 15mL de sangue para realizarmos exames laboratoriais. A retirada da pequena amostra de sangue poderá lhe causar um leve desconforto proveniente da picada da agulha e o local onde se coletou o sangue pode ficar roxo.

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

Qualquer outra informação sobre esta pesquisa poderá ser obtida com a pesquisadora principal Professora Maria das Graças Carvalho (31-34096881) ou com o médico reumatologista responsável Dra. Gilda Aparecida Ferreira (31- 32489300).

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