

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISA AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

ROSSANA SUELLE NASCIMENTO DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS DA MOLÉCULA HLA-G E DO
PERFIL DA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO JUVENIL (LESJ)

Recife
2015

ROSSANA SUELLE NASCIMENTO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS ISOFORMAS DA MOLÉCULA HLA-G E DO
PERFIL DA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO JUVENIL (LESJ)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Imunopatogênese de doenças crônicas, infecciosas e parasitárias.

Orientadora: Dr^a Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

Recife

2015

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

S237a Santos, Rossana Suelle Nascimento.
Avaliação da expressão das isoformas da molécula HLA-G e do perfil da resposta imune em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) / Rossana Suelle Nascimento Santos. - Recife: [s.n.], 2015.
71 p. : il., graf., tab., 30 cm.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva.

1. Lúpus Eritematoso Sistêmico - patologia. 2. Lúpus Eritematoso Sistêmico - imunologia. 3. Antígenos HLA-G – genética. 4. Antígenos HLA-G - imunologia. I. Silva, Norma Lucena Cavalcanti Licínio da. II. Título.

CDU 616.5-002.5

ROSSANA SUELLE NASCIMENTO DOS SANTOS

**Avaliação da expressão das isoformas da molécula HLA-G e do
perfil da resposta imune em pacientes com lúpus eritematoso
sistêmico juvenil (LESJ)**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Biociências e Tecnologia
em saúde do Centro de Pesquisa
Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz para obtenção do grau de Mestre
em Ciências.

Data de aprovação: 15/06/2015



Dr^a. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz

Dr^a. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fiocruz

Dr^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho
Departamento de Virologia – LIKA /UFPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que me concedeu o dom da vida e me deu forças para lutar pelos meus sonhos.

Aos meus pais e irmãos que sempre estiveram presente na minha jornada acadêmica me dando apoio necessário em cada etapa.

À Anne, por me ancorar em todos os momentos, comemorando cada vitória, enxugando minhas lágrimas, torcendo em cada desafio, rindo em cada piada e me mostrando o quão vazia seria minha vida sem ela.

A todos os meus amigos pelo carinho e amizade, por entenderem minha ausência em alguns momentos, por estarem sempre ao meu lado me incentivando e por todas as vezes que saímos e rimos de tudo que já vivemos.

A todos os meus colegas da pós-graduação por todas as aulas, seminários apresentados e por usarmos aplicativos de celular como centro de estudo.

A todos os amigos conquistados em dois anos de curso, em especial Sávio, Camis, Neta, Elisa, Lígia, Rômulo, Heytor, Veruska, João, Klarissa, Patrícia e Amanda, por todas as terapias durante o almoço nas quais dividimos o peso dos ELISAS errados, PCRs negativas, subclonagens que não funcionaram, sabemos que em cada dissertação nossa terá um pouquinho de cada um.

A todos do departamento de Imunologia, em especial Valéria e todos os seus alunos, pela convivência diária.

À Renan por toda ajuda na construção do meu trabalho e por todo aprendizado, sendo sempre um grande parceiro em todas as empreitadas laboratoriais.

A todos os alunos do grupo de pesquisa, Alessandra, Ester, Albert, Juliana, André, Renata, Maíra e Laís, por me ensinarem grande parte do que sei hoje e por dividirem tantos conselhos.

À minha orientadora, Dr^a Norma Lucena, que me deu a oportunidade desde a graduação para desenvolver meus trabalhos de graduação e mestrado. Agradeço por todo empenho, dedicação e paciência.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e a FACEPE, pelo suporte tecnológico e financiamento que foram parte integrante do meu trabalho.

SANTOS, Rossana Suelle Nascimento. Avaliação da expressão das isoformas da molécula HLA-G e do perfil da resposta imune em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ). 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

RESUMO

O lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) é uma doença inflamatória crônica causada pela produção de autoanticorpos, que reconhecem como estranhos antígenos próprios do organismo, e possuem alta morbidade e mortalidade em relação à doença no adulto. Em sua patogênese estão envolvidos fatores ambientais, hormonais, imunológicos e genéticos. Estudos de associação genética demonstraram que a susceptibilidade ao lúpus é poligênica, e entre os genes envolvidos está o HLA-G que é responsável pela regulação da resposta imune. No estudo, foi analisada a expressão de isoforma da molécula HLA-G e observamos o perfil de resposta imune em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil. Os pacientes que participaram do estudo foram selecionados no serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas e foi coletado sangue periférico de 10 pacientes no momento ativo e inativo do LESJ. O estudo comparou a expressão do mRNA do *HLA-G5*, *IL-10* e *TNF*, os níveis plasmáticos de sHLA-G e citocinas Th1, Th2 e Th17 entre os grupos com a doença ativa, inativa e o grupo de crianças saudáveis aplicando os testes de Mann-Whitney U e Kruskal-Wallis. Os resultados mostraram que pacientes com LESJ ativo apresentaram níveis elevados das citocinas IL-10 ($p=0,004$) e IL-6 ($p=0,011$), além de apresentarem expressão de mRNA do *TNF* mais elevada em relação ao grupo inativo ($p<0,05$). Mesmo com número reduzido, foi possível caracterizar que houve mudança do perfil de citocinas durante a ativação do LESJ, e a relação dessa ativação com a expressão de HLA-G solúvel, além de servir como base para proposta de um modelo de regulação imunológica, que poderá ser validado em futuros experimentos.

Palavras Chaves Lupus Eritematoso Sistêmico - patogênese - imunologia. Antígenos HLA-G - genética - imunologia. Citocinas - imunologia.

SANTOS, Rossana Suelle Nascimento. Evaluation of the expression of isoforms of HLA-G molecule and the profile of the immune response in patients with juvenile systemic lupus erythematosus (SLE). 2015. Dissertation (Master's degree of Bioscience and Biotechnology for Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

ABSTRACT

Juvenile systemic lupus erythematosus (JSLE) is a chronic inflammatory disease caused by the production of autoantibodies that recognize self-antigens as foreign, and have high morbidity and mortality in relation to the same disease in adults. The pathogenesis of SLE involving environment, hormonal, immunological and genetic factors. Genetic association studies demonstrated that susceptibility to lupus is polygenic, and between the genes involved is HLA-G which is responsible for the regulation of the immune response. In the study, we analyzed the isoform expression of HLA-G molecule and observed the immune response profile in patients with juvenile systemic lupus erythematosus. Patients in the study were selected at the Hospital of Rheumatology Clinics service and peripheral blood was collected from 10 patients in the active and inactive time of JSLE. The study compared the expression of HLA-G5, IL-10 and TNF mRNA, plasma levels of sHLA-G and Th1 Th2 and Th17 cytokines between groups with the disease active and inactive and the group of healthy children by applying the test Mann-Whitney U test and Kruskal-Wallis. The results showed that patients with active lupus high levels of IL-10 ($p=0,004$) and IL-6 ($p=0,011$), besides presenting mRNA expression TNF higher than the inactive group ($p < 0.05$). Even with few, we could characterize that there was a change of cytokine profile during activation of JSLE, and the ratio of activation with soluble HLA-G expression in addition to serving as a basis for proposing a regulation model immune, which can be validated in future experiments.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus - pathogenesis - immunology HLA-G Antigens - immunology – Cytokines - immunology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1- Critérios clínicos e laboratoriais para diagnóstico de Lúpus eritematoso sistêmico segundo o Colégio Americano de Reumatologia	18
Figura 1- Rearranjo alternativo da sequência de <i>HLA-G</i> e esquema da estrutura genética e molecular de cada isoforma	27
Figura 2- Etapas de ligação, transformação e seleção de clones recombinantes que foram utilizados para extração do plasmídeo com a sequência de <i>HLA-G5</i>	36
Figura 3- Análise de clones recombinantes para a confirmação da subclonagem da sequência da isoforma <i>HLA-G5</i>	42
Figura 4- Otimização da temperatura da reação da amplificação do pTA-HLAG5	43
Figura 5- Teste de diferentes concentrações de pTA-HLAG5 para construção da curva padrão utilizada na quantificação de mRNA de <i>HLA-G5</i> nos pacientes com LESJ	44
Figura 6- Análise da especificidade e reprodutibilidade da amplificação de pTA-HLAG5	45
Figura 7- Amplificação de cada experimento utilizando as mesmas concentrações de plasmídeo e a curva padrão construída a partir dos dados de cada amplificação	46
Figura 8- Curva padrão da amplificação da sequência <i>HLA-G5</i>	47
Figura 9- Relação entre a quantificação de mRNA do <i>HLA-G5</i> em pacientes com LESJ ativo e inativos	47
Figura 10- Comparação de mRNA do gene <i>IL-10</i> entre os grupos com LESJ ativo e inativo	48
Figura 11- Comparação dos valores do mRNA do <i>TNF</i> entre os pacientes com LESJ ativo e inativo	48
Figura 12- Relação entre os valores de <i>HLA-G</i> em sua forma solúvel entre pacientes com LESJ ativo, inativo e indivíduos saudáveis	49
Figura 13- Comparação dos níveis das citocinas entre os grupos de pacientes ativos e inativos e grupo saudável	50

Figura 14- Modelo de regulação de citocinas no grupo controle	53
Figura 15- Modelo de regulação de citocinas no grupo inativo	53
Figura 16- Modelo de regulação de citocinas no grupo ativo	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com Lúpus eritematoso sistêmico juvenil	40
Tabela 2- Valores de SLEDAI do grupo de pacientes com LESJ ativo e inativo	41
Tabela 3- Correlações entre HLA-G solúvel e citocinas nos grupos de crianças com LESJ ativo e inativo	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-dsDNA	Anticorpo anti-DNA de fita dupla
Anti-RNP	Anticorpo anti-Ribonucleoproteína
Anti-Sm	Anticorpo anti-Smith
bcl-2	<i>B cell lymphoma-2</i>
CAR	Colégio Americano de Reumatologia
CBA	<i>Citometric Bead Array</i>
CD	Células Dendríticas
cDNA	DNA complementar (sigla do termo <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
CT	Ciclo <i>Threshold</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBV	Vírus Epstein Barr
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FAN	Fator anti-nuclear
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
gapdH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HLA-G	Antígeno Leucocitário Humano G
IFN γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LB	Lurian Bertani
LED	Lúpus eritematoso discóide
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LESJ	Lúpus eritematoso sistêmico juvenil
LID	Lúpus induzido por drogas
mRNA	RNA mensageiro (sigla do termo <i>Ribonucleic acid</i>)
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Maior
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCBI	<i>National Center Biotechnology Information</i>
NK	Células Natural Killer

NT	Não traduzida
PAMPs	Padrão molecular associados à patógenos
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
PCR	Reação em Cadeia da polimerase
MRNA	RNA mensageiro
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
sHLA-G	Antígeno Leucocitário Humano G solúvel
SLEDAI	Índice de atividade da doença lupus eritematoso sistêmico
SNC	Sistema Nervoso Central
Th	Células T helper
TLR	Receptor Toll-Like
TNF	Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO	15
1.1 Lúpus eritematoso sistêmico	15
1.2 Epidemiologia do LES	16
1.3 Diagnóstico do LES	17
1.4 Etiologia do LES	20
1.4.1 <u>Fatores Ambientais</u>	20
1.4.2 <u>Fatores Hormonais</u>	21
1.4.3 <u>Fatores Genéticos</u>	23
1.4.4 <u>Fatores Imunológicos</u>	23
1.5 O Papel das citocinas no lúpus	25
1.6 Relação entre Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G) e o LES	26
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivo Específico	29
3 PACIENTES E MÉTODOS	30
3.1 Desenho de estudo	30
3.2 População e local de estudo	30
3.3 Critérios de inclusão e exclusão	31
3.4 Procedimentos laboratoriais	32
3.4.1 <u>Processamento de amostras</u>	32
3.4.2 <u>Extração de RNA e síntese de cDNA</u>	32
3.4.3 <u>Construção do plasmídeo pTA-HLAG5</u>	33
3.4.3.1 <i>Obtenção do fragmento do mRNA de HLA-G5 para clonagem</i>	33
3.4.3.2 <i>Ligação da sequência HLA-G5 no vetor pTA</i>	33
3.4.3.3 <i>Transfomação de células bacterianas com plasmídeo recombinante pTA-HLAG5</i>	34
3.4.3.4 <i>Seleção de clones recombinantes pela marca de seleção</i>	35
3.4.3.5 <i>Extração do plasmídeo contendo sequência do gene HLA-G5</i>	36
3.4.3.6 <i>Padronização da PCR em tempo real para detecção de mRNA de HLA-G5</i>	37

3.4.4 <u>Quantificação relativa de mRNA</u>	38
3.4.5 <u>Detecção do perfil de citocinas</u>	38
3.4.6 <u>Detecção do nível de HLA-G solúvel plasmático</u>	38
3.4.7 <u>Análise Estatística</u>	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Perfil clínico e laboratorial dos pacientes coletados com Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil	40
4.2 Obtenção da sequência de mRNA do HLA-G5 após subclonagem	41
4.3 Padronização da PCR em tempo real (qPCR) para quantificação de HLA-G5 nos pacientes com LESJ	42
4.4 Relação entre atividade do LESJ e índices de HLA-G e citocinas	47
4.4.1 <u>Relação entre expressão do mRNA do <i>HLA-G5</i>, <i>IL-10</i> e <i>TNF</i> e a atividade do LESJ</u>	47
4.4.2 <u>Presença do sHLA-G e do perfil de citocinas Th1, Th2 e Th17 e sua relação com a atividade do LESJ</u>	49
4.5 Correlação entre sHLA-G e citocinas no LESJ ativo e inativo	52
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
Anexo A – Parecer do Comitê de ética do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães	66
Anexo B – Parecer do Comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco	69
Anexo C – Questionário com valores das manifestações clínicas para cálculo do SLEDAI	72

SANTOS, R. S. N.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Lúpus eritematoso sistêmico

As doenças autoimunes resultam da quebra da tolerância imunológica no reconhecimento correto de antígenos próprios, levando a resposta do sistema imune contra o próprio organismo. O lúpus é uma das doenças autoimunes mais comuns, possuindo quatro formas de apresentação: lúpus eritematoso sistêmico (LES), lúpus eritematoso infanto-juvenil (LESJ), lúpus eritematoso cutâneo (LED), lúpus induzido por drogas (LID), sendo o primeiro o tipo mais comum conhecido simplesmente como lúpus (HILAS, 2012; MAIDHOF; VARGAS; ROMANO, 2009).

LES é uma doença inflamatória autoimune crônica causada pela produção de autoanticorpos, que reconhecem como estranhos antígenos próprios do organismo, com isso, há formação e deposição de imunocomplexos, sendo estes responsáveis pela reação inflamatória e dano tecidual em diferentes órgãos e sistemas do paciente, podendo afetar órgãos como rins, pulmões, pele, sistema nervoso, musculoesquelético e outros. As manifestações clínicas e os achados sorológicos são bastante heterogêneos, sua patogênese ainda permanece desconhecida, mas é provavelmente de origem multifatorial, sendo influenciado por fatores genéticos, hormonais, imunológicos e ambientais (AMUR; PAREKH; MUMMANENI, 2012; D'CRUZ; KHAMASHTA; HUGHES, 2007; LEE; BAE, 2010).

O LESJ é diagnosticado no início da infância ou na adolescência até os 18 anos (SILVA; AVCN; BRUNNER, 2012).

Apesar de possuírem muitas características clínicas similares, o envolvimento renal e o neurológico são mais frequentes em crianças e adolescentes acometidas quando comparadas com adultos, caracterizando uma doença mais grave, com maior dano e maior taxa de mortalidade (BRUNNER et al., 1999; FONT et al., 1998). Dentre os pacientes com LESJ, 77% necessitam de moderada/ alta dose de corticóide, enquanto que apenas 16% dos pacientes com LES adulto, além de doses mais elevadas de imunossupressores para o controle do LESJ. Ao longo de quase 40 anos foi observada uma crescente melhora na sobrevida de cinco anos dos pacientes com LES, nos anos 50 e 60 a sobrevida aumentou de 17% para 69% dos

SANTOS, R. S. N.

pacientes, e continuou melhorando nas décadas de 80 e 90 com sobrevida passando de 83% a 93% dos pacientes (KLEIN-GETELMAN; REIFF; SILVERMAN, 2002).

1.2 Epidemiologia do LES

A incidência do LES é de aproximadamente 1 a 10 casos por 100.000 habitantes e a prevalência de 20 a 70 por 100.000 habitantes por ano. A taxa de incidência difere entre diferentes áreas geográficas, etnias, e entre grupos de diferentes idades e gênero (PONS-ESTEL et al, 2010).

Na Europa a incidência varia entre 1,0 a 3,5 por 100.000 habitantes em diferentes regiões. Na Espanha, a taxa de incidência de lúpus difere entre a região norte (2,15 por 100.000) e nordeste (3,5 por 100.000) do país (ALONSO et al., 2011)

A incidência também varia em diferentes populações no continente asiático. Na China, a incidência encontrada foi de 3,1 por 100.000, com Taiwan apresentando uma taxa de 8,1 por 100.000 habitantes, enquanto que no Japão a incidência variou entre 0,9-2,8 por 100.000 habitantes (JAKES et al., 2012).

Nas Américas, a incidência na população Afro-caribenha de Martinica é de 4,7 por 100.000; enquanto nos Estados Unidos, que apresenta uma população mais heterogênea, a taxa é de 5,1 por 100.000 (FLOWER et al., 2012). No Brasil, existem poucos estudos sobre incidência de lúpus. A taxa de incidência encontrada na cidade de Natal, no nordeste brasileiro, foi de 8,7 por 100.000, enquanto que a cidade de Cascavel, ao sul do Brasil, apresentou incidência de 4,8 por 100.000 habitantes (BEZERRA et al., 2005).

A influência da etnia na ocorrência da doença foi observada na Austrália, onde a população de descendência aborígine apresentou incidência (11 por 100.000) e prevalência (56,6 a 96,8 por 100.000) maiores que a população branca, cuja taxa de incidência não foi relatada, e a prevalência foi de 19,3 por 100.000 habitantes (JAKES et al., 2012).

A frequência de mulheres afro-americanas acometidas pelo LES também foi superior em 3 a 4 vezes do que mulheres caucasianas considerando a mesma área

SANTOS, R. S. N.

geográfica, mostrando que a predisposição genética é importante na gênese da doença (DANCHENKO; SATIA; ANTHONY, 2006; KICHUL et al.,2012).

Além das diferenças das taxas de incidência da doença em diferentes áreas geográficas e etnias, há diferenças entre grupos de populações da mesma raça vivendo em diferentes regiões do mundo, sugerindo o envolvimento de fatores biológicos no desenvolvimento da doença (SILVA; AVCN; BRUNNER, 2012).

A maioria dos casos de lúpus são mulheres. Independente da faixa etária, as mulheres representam cerca de 70 a 90% dos casos em diferentes casuísticas de diferente área geográfica, sugerindo além da genética, o envolvimento hormonal na predisposição ao surgimento da doença (AMUR, PAREKH e MUMMANENI, 2012; CONDE et al.,1998). A importância de fatores hormonais na ocorrência do lúpus é ilustrada pelo fato de na primeira década de vida (4:3) e segunda década de vida (4:1) a proporção entre mulheres:homens acometidos é bem menor que essa proporção (9:1) na idade adulta; associado a uma diminuição (5:1) na população idosa. Isso deve-se em parte pela maior incidência ocorrer nas mulheres com idade entre 15 e 44 anos, faixa etária que corresponde a idade fértil (níveis altos estrógenos), enquanto que nos homens a maior ocorrência de casos é na faixa etária entre os 45 e 64 anos, pós-andropausa (níveis baixos de testosterona) (AMUR; PAREKH; MUMMANENI, 2012; DANCHENKO; SATIA; ANTHONY, 2006; MINA; BRUNNER, 2010; SILVA; AVCN; BRUNNER, 2012).

1.3 Diagnóstico do LES

O diagnóstico de LES é firmado com base em critérios clínicos e laboratoriais estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (CAR) em 1997 (Quadro 1) (CONDE et al., 1998). A presença de quatro dos 11 critérios estabelecidos tem especificidade de 95% e sensibilidade de 75% para o diagnóstico de LES (BEZERRA et al., 2005; SMITH; GORDON, 2010).

SANTOS, R. S. N.

Quadro 1- Critérios clínicos e laboratoriais para diagnóstico de Lúpus Eritematoso Sistêmico segundo o Colégio Americano de Reumatologia.

Critérios clínicos	Frequência
1. Eritema malar (asa de borboleta)	18,1 – 60,4%
2. Lesões discoides cutâneas	11,1 – 34,8%
3. Fotossensibilidade	18,1 – 66,5%
4. Úlceras orais e/ou nasofaríngeas	16,7 – 21,3%
5. Artrite não-erosiva em duas ou mais articulações	25,4 – 87,2%
6. Serosite (pleurite ou pericardite)	25,6 – 29,1%
7. Alterações neurológicas (convulsões ou psicose)	11,6 – 15,2%
8. Alteração renal (proteinúria >0,5g/dia, ou cilindros celulares na urina)	45,1 – 62,5%
9. Alteração hematológica (anemia hemolítica ou leucopenia, linfocitopenia ou plaquetopenia)	59,8 – 66,7%
Imunológico	
10. Anticorpo antiDNA de dupla hélice	33,9 – 50%
11. Anticorpo antiSm	10,8 – 33,3%
12. Anticorpo anticardiolipina	41,5 – 66,6%
13. Fator antinuclear (FAN) positivo	75 – 97%

Fonte: Conde (1998)

As manifestações clínicas mais comuns no lúpus são fadiga, fotossensibilidade, *rash* malar (*rash* em forma de borboleta), lesão discóide, acometimento mucocutâneo, serosite, pericardite, artrite ou artralguas. Características clínicas como lesões de pele, artrite, serosite são semelhantes em LES e LESJ, mas pacientes com LES adulto apresentam maior fotossensibilidade, lesões na pele discóide, e doença cardio pulmonar, enquanto as crianças e adolescentes acometidos apresentam maior envolvimento renal e neurológico, presença do eritema malar, além de anormalidades hematológicas e sorológicas (MINA; BRUNNER, 2010).

O envolvimento renal é comum no curso do LESJ, com 90% dos pacientes afetados no primeiro ano do diagnóstico. A síndrome nefrítica é caracterizada pela presença de proteinúria e/ou cilindrúria e altos níveis séricos de creatinina, podendo evoluir para a glomerulonefrite proliferativa difusa, a forma mais comum de nefrite em pacientes com LESJ, que é a mais grave e se não for tratada evolui ao estágio final da doença renal, podendo levar ao óbito (KLEIN-GETELMAN; REIFF; SILVERMAN, 2002)

As alterações no SNC incluem desde cefaléia persistente, perda de memória, depressão, distúrbio de personalidade até convulsão. Sintomas neuropsiquiátricos são observados de 33% a 60% de pacientes adultos com LES, o sintoma mais comum é a cefaleia que pode ter várias origens, podendo ser secundária a fadiga ou

SANTOS, R. S. N.

tensão, mas podem também ser secundárias a trombose venosa cerebral e hipertensão intracraniana, estas são mais comuns em crianças que em adultos (KLEIN-GETELMAN; REIFF; SILVERMAN, 2002; SAUMA; NUNES; LOPES, 2004).

Um dos primeiros achados hematológicos em pacientes com LES é a leucopenia, podendo também estar presente anemia e trombocitopenia. Dentre o grupo de pacientes com LESJ, a anemia ocorre em 35% das crianças menores de 1 ano, e em 77% nos adolescentes; mas a leucopenia (prevalência de 74%) se apresenta de forma similar entre adultos e crianças (MINA; BRUNNER, 2010).

Os níveis de C3 e C4 podem estar baixos pela pouca produção ou por estarem sendo consumidos, principalmente durante a atividade da doença (SMITH; GORDON 2010).

Os achados laboratoriais da doença incluem a presença de anticorpos contra os antígenos nucleares, tais como: anti-dsDNA, anti-Sm (Anti- Smith), que são encontrados em 60% dos pacientes. A pesquisa do FAN é indispensável ao diagnóstico do lúpus e sua presença em níveis elevados é um marcador de lesão, uma vez que o dano tecidual é promovido pelo depósito de imunocomplexos (anticorpos antinúcleo associados a antígenos nucleares mais complemento), ou por anticorpos citotóxicos (anti-hemácias, antiplaquetas ou anti-neurônios), que também possuem reatividade anti-nuclear. Anticorpos anti-cardiolipina são encontrados em cerca de 10%-30% dos pacientes sendo relacionado com trombose e perda fetal em gestante com LES. O Anti-Sm, extremamente específico para o LES, ocorre entre 10-30% dos pacientes, nesta mesma proporção é visto o Anti-Ribonucleoproteína característico de pacientes com sobreposição de sintomas (SMITH; GORDON, 2010; VARGAS; ROMANO, 2009). A presença de altos níveis de anti-dsDNA é comum no LESJ, presente em 61%-93% das crianças, os outros auto-anticorpos, anti-Sm, anti-rnp, anti-Ro/SSA, não diferem entre LES adulto e infantil (FONT et al., 1998).

Remissões espontâneas ou terapêuticas são frequentes em pacientes com comprometimento articular, de pele ou serosas, e mais raras em pacientes com acometimento renal ou do sistema nervoso central (SNC), cujo prognóstico é mais desfavorável, sendo o dano renal o principal responsável pelos casos de óbitos em pacientes com lúpus (CONDE et al., 1998; SAUMA; NUNES; LOPES, 2004).

SANTOS, R. S. N.

Dentre os vários questionários usados para avaliar a atividade do LESJ o mais utilizado é o SLEDAI (Índice de Atividade da Doença Lúpus Eritematoso Sistêmico) ao diagnóstico e durante o acompanhamento do tratamento. Todos os atributos utilizados para calcular o SLEDAI são claramente definidos e contidos em um formulário (Anexo C). Todos os sintomas e achados clínicos e laboratoriais presentes no paciente no prazo de 10 dias anteriores à avaliação é computado para a definição do SLEDAI. A pontuação final (soma de todas as pontuações ponderadas) tem resultado entre 0 e 105. (BRUNNER et al., 1999, 2008). O LESJ apresenta gravidade superior à doença no adulto, sendo o SLEDAI médio no adulto de 9.3 enquanto que no grupo infantil o SLEDAI é de 16.8 (MINA; BRUNNER, 2010).

1.4 Etiologia do LES

Os fatores etiológicos do LES ainda são desconhecidos, mas múltiplos fatores têm sido associados ao desenvolvimento da doença, dentre esses fatores ambientais, hormonais, genéticos e imunológicos (MAIDHOF; HILAS, 2012).

1.4.1 Fatores ambientais

Exposição a raios solares é considerada fator desencadeante do lúpus, principalmente em pessoas com histórico de sensibilidade à luz solar. A radiação ultravioleta induz a apoptose de queratinócitos com a liberação de antígenos nucleares, e a resposta autoimune em pacientes susceptíveis (WALSH; GILCHRIST 2006).

Da mesma forma, agentes infecciosos podem desencadear a perda da tolerância por diferentes mecanismos, incluindo dano aos tecidos com liberação de antígenos próprios, que de forma cruzada pode levar a produção de autoanticorpos (DANCHENKO; SATIA; ANTHONY, 2006).

Dentre os fatores etiológicos a infecção viral vem sendo estudada amplamente e o agente mais citado como desencadeador do LES é o vírus Epstein Barr (EBV). Em seu estado de replicação, o vírus pode estimular o sistema imune a produzir anticorpos, que cruzadamente pode reconhecer proteínas humanas,

SANTOS, R. S. N.

iniciando o processo de autoimunidade. Contudo, para a perpetuação das alterações e desenvolvimento do LES, são necessárias, predisposição genética, influência do fator ambiental e perda da tolerância imunológica. A associação entre EBV e LES é reforçada pela presença de altos títulos de anticorpos anti-EBV em pacientes com LES, assim como, pela constatação de que a infecção pelo EBV antecede o aparecimento das alterações autoimunes, que ocorrem no LES (JAMES et al., 1997)

Associação entre lúpus e atividades ocupacionais que envolvam contato com tinta, corantes, reveladores, solventes e sílica também tem sido observada (COOPER et al., 2010).

O lúpus induzido por drogas (LID) ocorre em 10% dos pacientes, atingindo principalmente caucasianos, e na mesma proporção entre o sexo masculino e feminino. Doses convencionais contínuas do antiarrítmico procainamida e o vasodilatador anti-hipertensivo hidralazina têm sido associadas ao LID. Dentre os pacientes que fazem uso da procainamida, 20% desenvolvem lúpus, enquanto que o uso da hidralazina induz lúpus em 5% a 8% dos pacientes hipertensos em tratamento. Os principais mecanismos envolvidos na imunopatogenia do LID são: metabolismo oxidativo das drogas, interferência dos metabólitos das drogas na tolerância imunológica, inibição da metilação do DNA, exposição a antígenos próprios ocultos e indução a apoptose de linfoblastos humanos ativados (URETECH, 2005; MOTA et al., 2007).

1.4.2 Fatores hormonais

Respostas imunes básicas são distintas quando comparada entre homens e mulheres, evidências experimentais e clínicas sugerem que a autoimunidade é influenciada pelo gênero, a reatividade imune é mais evidenciada no sexo feminino que o masculino (WHITACRE, 2001). Em ensaios experimentais, fêmeas de camundongo apresentam altos níveis de imunoglobulinas e alta produção de anticorpos mediante estimulação com antígenos primários e secundários. Camundongos machos, em contrapartida, são mais propensos a infecções (INVERZZINI et al., 2009; ZANDMAN-GODDARD; PEEVA; SHOENFELD, 2006).

SANTOS, R. S. N.

A tendência de remissão do lúpus durante a gravidez e após a menopausa ou induzida pela ciclofosfamida, sugere também que os hormônios femininos são cruciais na regulação da atividade do lúpus no humano (RUBTSOV, 2010; ZANDMAN-GODDARD; PEEVA; SHOEFELD, 2006). Outro estudo mostra que manifestações da doença na pele, serosite e envolvimento renal são mais comuns em homens, enquanto que nas mulheres a atividade da doença é mais intensa e as lesões renais e do SNC são mais graves (ZANDMAN-GODDARD; PEEVA; SHOEFELD, 2006).

Hormônios sexuais femininos como a prolactina e o estrógeno são considerados moduladores da resposta imune, regulando a maturação e seleção das células B autoreativas e produção de autoanticorpos, esses hormônios permitem que células B autoreativas escapem dos mecanismos de tolerância imunológica, enquanto que a testosterona, hormônio sexual masculino, aparece como imunossupressor de anticorpos anti-DNA (QUINTERO et al., 2012; RUBTSOV et al., 2010).

No LES, a resposta imune humoral, resultante da atividade de células T CD4⁺ Th2, que induz a ativação de células B e produção de anticorpos, está desregulada e aumentada em relação a indivíduos normais. Estudos com modelo animal mostram os efeitos de hormônios sexuais no aumento da resposta imune. Os efeitos do estrógeno no sistema imune são bem conhecidos, ele regula positivamente a expressão do gene *bcl-2*, induzindo o bloqueio da tolerância das células B virgens; facilitando a ativação e sobrevivência de células B autoreativas, e dificultando a produção de células B potencialmente protetoras. *In vitro*, foi observado que o estrógeno reduz a apoptose de células mononucleares no sangue periférico, ativa células dendríticas (CD), e aumenta a produção de anticorpos (PETRI, 2008; TEDESCHI; BERMAS; COSTENBADER, 2013).

A imunidade mediada por células T também é modulada por hormônios. O estrógeno induz resposta imune exacerbada à presença de citocinas do perfil Th2, quando comparada com homens. Além do estrógeno, outro hormônio que tem grande significado no estudo do LES é a prolactina. A via de sinalização da prolactina leva a transcrição de genes envolvidos na proliferação de células T, secreção de anticorpos e diminuição da apoptose de células B. Altos níveis de

SANTOS, R. S. N.

prolactina em alguns pacientes com LES estão associados com altos títulos de anticorpos anti-DNA e exacerbação da doença (PENELL; GALLIGAN; FISH, 2012).

1.4.3 Fatores Genéticos

As principais evidências da associação de fatores genéticos com a ocorrência de LES são: concordância entre gêmeos monozigóticos em 20% - 40% dos casos, história familiar de lúpus ou doença autoimune (HARLEY et al., 2009).

O LES foi associado com mutações localizadas no braço curto do cromossomo 6 (BARCELOS et al., 2009), incluindo genes do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) classe II e III. A maior frequência de alelos do grupo HLA-DRB1*03 em caucasianos, DRB1*08 em afroamericanos, e DRB1*15 em hispânicos e egípcios, tem sido associado ao maior risco de desenvolvimento do LES, independente da idade do início da doença (HUSSAIN *et al.*, 2011; MOSAAD *et al.*, 2010; REVELLE *et al.*, 1991; REVELLE *et al.*, 1998; TSAO, 2003).

A presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) envolvidos na ativação ou função de células B e T também têm sido relacionadas a patogêneses no LES. Os principais genes são *C1q*, *C4*, *ITGAM* (envolvidos no processamento de imunocomplexo), *TREX1*, *TNFAIP3*, *IRF5* e *STAT4* (via de sinalização de Interferons (IFN) tipo I e receptor Toll-like - TLR) e *BANK1*, *PTPN22*, *TNFSF4* (transdução de sinais imunes nos linfócitos). (CROW, 2008; HARLEY et al., 2009; KAISER; CRISWELL, 2010; TSAO, 2003).

Alteração na expressão de C4 em homozigose apresenta risco de desenvolvimento de LES em 75% dos casos, enquanto que o *C1r* ou *C1s* em 50%, e o *C2* em 10%-30% de indivíduos caucasianos (MINA; BRUNNER, 2010).

1.4.4 Fatores imunológicos

Paciente com lúpus tem apresentado maior prevalência de polimorfismos em genes relacionados à formulação da resposta imune, incluindo moléculas de histocompatibilidade, componentes da imunidade inata como moléculas do sistema complemento e receptor Toll-like (TLR), componentes da imunidade adquirida como

SANTOS, R. S. N.

citocinas; além de fatores hormonais, que estão sob controle genético (HARLEY et al., 2009).

O controle da população linfocitária gerada pela resposta imune é mantido pelo fenômeno de apoptose mediado pelos fagócitos, macrófagos e células dendríticas, e dificuldades na eliminação dessas células apoptóticas podem favorecer o desenvolvimento de doenças autoimunes, decorrentes da exposição de autoantígenos nucleares (WAHREN-HERLENIUS; DORNER, 2013).

Os autoantígenos liberados pelas células apoptóticas podem ser apresentados por células do tecido lesado, que passam a expressar moléculas HLA de classe I e classe II influenciadas por mediadores inflamatórios presentes na lesão. Antígenos nucleares humanos liberados podem, através do mimetismo molecular com antígenos bacterianos e/ou a ativação de TLR 7, 8 e 9, reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) com especificidade para ácidos nucleicos e ribonucleoproteínas, induzindo a perda de autotolerância com ativação dos linfócitos B e produção de autoanticorpos (REKVIG et al., 2012; SOUZA et al., 2010). A deficiência de moléculas do complemento também foi relacionada à ocorrência de lúpus, 90% dos casos de deficiência de C1q e 75% dos de C4 desenvolvem lúpus ao longo da vida (SOUZA et al., 2010).

A apresentação de antígenos pela ativação células T auto reativas, polarizando a resposta imune adaptativa (Th1, Th2 ou Th17). A liberação de INFs tipo I e outras citocinas pró-inflamatórias serão responsáveis pela manutenção dos clones auto reativos e diferenciação de CDs (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012)

O paciente com lúpus apresenta diminuição das células T citotóxicas e linfócitos T reguladores (inibidores de resposta imunológica), aumento de células T CD4+, excesso de linfócito B por defeitos na apoptose, ativação e produção de anticorpo policlonal (estágios iniciais), e aumento da produção de citocinas Th2 (KAMER et al., 2002, SHERER et al., 2004).

Outras moléculas importantes na regulação do sistema imune são as citocinas, estas são intimamente relacionadas ao LES, seus níveis são encontrados elevados nos pacientes com LES, de forma que são essenciais nos estudos na etiopatogenia da doença (FARID et al., 2011, LOPEZ; GUTIÉRREZ; SUARÉZ, 2010).

SANTOS, R. S. N.

1.5 O papel das citocinas no LES

A interleucina-2 (IL-2) está envolvida no processo de ativação e proliferação de células T, e se apresenta diminuída em pacientes com LES implicando em uma diminuição na atividade citotóxica, função defeituosa de células T reguladoras e diminuição da morte celular (CRISPIN et al., 2010).

IL-17 também tem sido associada na patogênese de várias doenças autoimunes, incluindo LES. IL-17 é produzida principalmente pela ativação de células T, sendo a grande quantidade de células T CD4⁺ no paciente com lúpus responsável pelo alto nível sérico de IL-17. O aumento na expressão de IL-17 apresenta correlação com atividade da doença, como exemplo, células T produtoras de IL-17 foram encontradas em infiltrados renais de pacientes com nefrite lúpica (CRISPIN et al., 2010; DOUREAU et al., 2009; HAGIWARA et al., 1996; HOUSSIAU et al., 1995; PARK et al., 1998).

A citocina IL-10 foi descoberta como “fator inibidor da síntese de citocinas”, por ser capaz de inibir a produção de citocinas por células Th1 de camundongos em cultivos celulares (MOORE et al., 2001). Ela é considerada como a principal citocina anti-inflamatória, sendo assim apresenta influência em várias células do sistema imune incluindo linfócitos Th1 e Th2, linfócitos B, células NK, monócitos, macrófagos, mastócitos, neutrófilos e eosinófilos (KARIMABAD et al., 2013). A IL-10 ainda atua inibindo a proliferação dos linfócitos T CD4⁺ e produção de IL-2 e IFN- γ pelas células Th1, e IL-4 e IL-5 pelas células Th2, mas não é capaz de diminuir a produção de IL-17 pelas células Th17. O gene *IL-10* está localizado num importante locus de susceptibilidade para LES no cromossomo 1 (JOHANNESON et al., 2002) e ainda atua aumentando a proliferação, diferenciação e produção de anticorpos pelos linfócitos B; essa produção exarcebada de anticorpos pode explicar a hiperatividade dos linfócitos B e maior produção de autoanticorpos no lúpus. Vários estudos encontraram níveis elevados dessa citocina em pacientes com LES, e correlação com atividade da doença (HAGIWARA et al., 1996; HOUSSIAU et al., 1995; PARK et al., 1998)

O TNF é uma importante citocina pró-inflamatória e imunoregulatória com efeito em várias células tanto da imunidade inata quanto adaptativa, e está

SANTOS, R. S. N.

diretamente envolvida com apoptose (POSTAL; APPENZELLER, 2011). Ele estimula a produção de citocinas inflamatórias, entre elas IL-1 e IL-6, aumenta a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular e também ativação dos neutrófilos. Nos linfócitos B, o TNF age como um fator de crescimento estimulando a produção de autoanticorpos, e nos linfócitos T além de estimular a proliferação dessas células, aumenta a expressão de moléculas do MHC, e a produção do IFN γ , aumentando a ação pró-inflamatória (ARINGER; SMOLEN, 2003). Vários estudos demonstraram maior nível sérico de TNF em pacientes com LES comparado com grupo controle saudável, e alguns desses estudos houve associação do TNF com atividade da doença, sugerindo um papel importante do TNF na regulação da inflamação e na apoptose celular (LÓPEZ; GUTIÉRREZ; SUÁREZ, 2010; POSTAL; APPENZELLER, 2011)

Várias evidências sugerem a participação do IFN γ na patogênese do LES. O seu gene está localizado num locus de susceptibilidade para LES (GAFFNEY et al., 1998). Nível sérico elevado do IFN γ foi encontrado em pacientes com LES, e apresentou correlação com atividade da doença. Estudos *in vitro* demonstraram maior expressão do mRNA do IFN- γ em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com lúpus do que grupo controle saudável após estimulação com mitógenos. (FUNAUCHI et al., 1991)

1.6 Relação entre o Antígeno Leucocitário Humano G (HLA-G) e o LES

Através de estudos de associação genética demonstrou-se que a susceptibilidade ao lúpus é poligênica e mais de 20 loci com genes ligados ao lúpus e seus respectivos cromossomos já foram descritos (RAHMAN; ISENBERG, 2008).

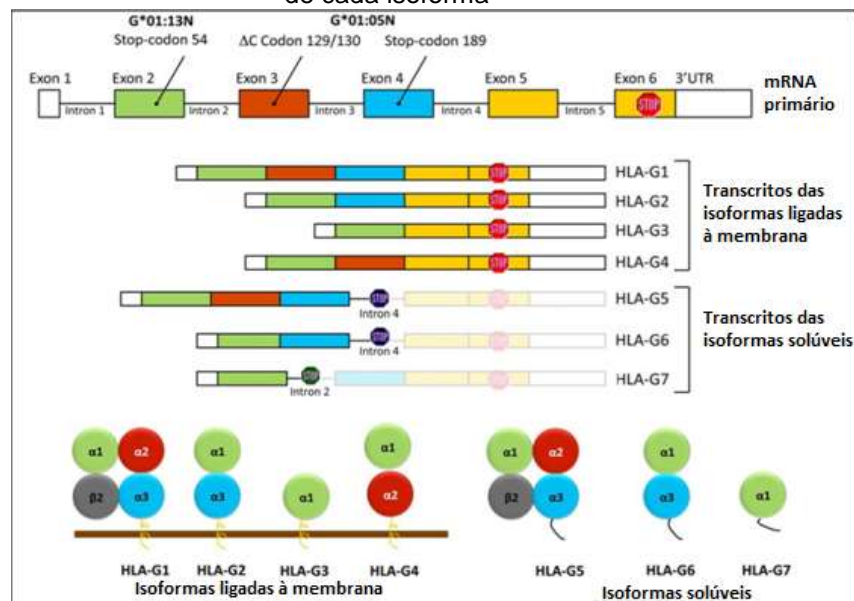
Os genes do MHC são altamente polimórficos e expressos de forma codominante em cada indivíduo. O MHC está dividido em três classes (I, II e III) e ocupa região de aproximadamente 4 megabases de DNA no braço curto do cromossomo 6 e codificam os chamados antígenos leucocitários humanos (HLA). Além de influenciarem na rejeição a transplantes de órgãos, os genes do MHC estão envolvidos na susceptibilidade a um amplo espectro de doenças infecciosas e

SANTOS, R. S. N.

doenças crônicas não infecciosas, tais como câncer e doenças autoimunes (PIRRI et al, 2009; ROUSSEAU et al, 2003).

O antígeno leucocitário humano G (HLA-G) é uma molécula do MHC de classe I não clássica ou do grupo Ib. A estrutura da molécula do HLA-G assemelha-se as outras moléculas clássicas do HLA de classe I. No entanto, o gene do *HLA-G* apresenta algumas características próprias como baixo polimorfismo em sua região codificadora e expressão limitada em determinados tecidos. Existem sete diferentes isoformas da molécula, geradas pelo rearranjo alternativo de éxons e íntrons, sendo quatro ligadas à membrana (G1-G4), e três formas solúveis (G5-G7) (Figura 1) (CAROSELLA et al, 2008b; CONSIGLIO et al., 2011; MARTINEZ-LASO et al., 2013; RIZZO et al, 2008).

Figura 1-Rearranjo alternativo da sequência de *HLA-G* e esquema da estrutura genética e molecular de cada isoforma



Fonte: Donadi et al. (2011)

Legenda: Estrutura do mRNA completo do gene *HLA-G* com seus éxons e íntrons, as formas lineares transcritas das isoformas solúveis e ligadas à membrana a partir de rearranjos alternativos do mRNA e as formas estruturais de cada isoforma

Funcionalmente, HLA-G inibe a atividade citolítica das células NK e linfócitos T, a resposta de células T CD4+ aloproliferativas, a proliferação de células T e NK, a maturação das células apresentadoras de antígenos e leva a indução de células T reguladoras. A molécula de HLA-G exerce a maioria dessas funções através da sua capacidade de ligar-se a vários receptores inibitórios localizados na superfície

SANTOS, R. S. N.

celular dessas células. Outro mecanismo de ação dessa molécula está relacionado ao fenômeno da trogocitose, que é a captação intercelular de HLA-G pela incorporação de fragmentos de membrana que expressam essa molécula, ou seja, células T ou NK efectoras que não transcrevem HLA-G podem tornar-se temporariamente HLA-G positivas adquirindo um perfil imunossupressivo e perdendo sua capacidade de células efectoras (CAROSELLA et al., 2008a, 2008b).

A variabilidade genética na região 3' não traduzidas (NT) do gene *HLA-G* mostrou-se associada a ocorrência de lúpus, sendo os genótipos 14pb INS-INS, +3110 C-C e +3142 G-G mais frequentes em pacientes adultos brasileiros com lúpus (LUCENA-SILVA et al., 2013). Rizzo e colaboradores mostraram também que a forma solúvel do HLA-G (sHLA-G) está diminuída no plasma de pacientes com lúpus em relação ao controle normal, sugerindo uma menor regulação negativa pelo HLA-G sobre a resposta imune tenha um papel importante na patogênese da doença (RIZZO et al., 2008).

A ação tolerogênica da molécula HLA-G está relacionada ao seu efeito inibitório sobre o sistema imune, de forma que, o estudo da expressão da *HLA-G* no lúpus é muito importante para a compreensão do controle do fenômeno de tolerância/autoimunidade. Sabendo que (i) a frequência entre os alelos relativos a sítios polimórficos na região 3'NT no gene *HLA-G* diferem em pacientes com lúpus e controles saudáveis (LUCENA-SILVA et al., 2013), (ii) os haplótipos definidos pelo polimorfismo na sequência 3'NT do gene *HLA-G* podem influenciar diferentemente a expressão de HLA-G (DI CRISTOFARO et al., 2013), (iii) a concentração de sHLA-G no plasma de paciente com lúpus é menor do que em indivíduos saudáveis (RIZZO et al., 2008), (iv) o lúpus juvenil é mais grave que o adulto e menos estudado (SILVA; AVCN; BRUNNER, 2012), nesse projeto pretendemos estudar a regulação imune exercida pelo HLA-G no lúpus juvenil.

SANTOS, R. S. N.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da expressão da proteína HLA-G solúvel na resposta imunológica de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) relacionando esses níveis de expressão com a atividade da doença.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a produção de sHLA-G em plasma de sangue periférico dos pacientes com LESJ ativo e inativo.
- b) Relacionar os níveis de citocinas (Th1, Th2 e Th17) no plasma dos pacientes com LESJ ativo e inativo.
- c) Analisar a expressão de mRNA de HLA-G5, IL-10 e TNF em células mononucleares isoladas de sangue periférico dos pacientes com LESJ e relacionar com a atividade da doença.

SANTOS, R. S. N.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Desenho de estudo

O presente estudo é descritivo de um grupo de pacientes diagnosticados com LESJ, selecionados a partir de uma coorte prospectiva de pacientes que apresentaram no período de estudo a doença na forma ativa e depois inativa e vice-versa, cuja expressão diferencial de HLA-G e citocinas foram investigadas.

Este projeto foi realizado em conjunto com o médico Reumatologista André Cavalcanti, doutorando do programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde, responsável pelo diagnóstico, acompanhamento e tratamento dos pacientes com LESJ. O Projeto foi aprovado pelo Comitê de ética do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães CAEE: 02400512.2.3001.5190 e pelo da Universidade Federal de Pernambuco CAEE: 02400512.2.0000.5208.

3.2 População e local do estudo

Os pacientes convidados para o estudo foram atendidos no Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e diagnosticados com Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil (LESJ) de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia e idade máxima ao diagnóstico de até 18 anos. Ao serem convidados a participar do estudo, os responsáveis por estes pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) concordando em participar da pesquisa, respondendo questionário de pesquisa sobre a história da doença, e permitindo a coleta de sangue periférico para a realização dos testes laboratoriais.

A população de pacientes desse estudo possui idade atual entre 12 e 20 anos, tendo sido diagnosticados por apresentarem pelo menos quatro dos onze critérios para definição de lúpus. De acordo com o protocolo clínico, os pacientes foram submetidos periodicamente à avaliação clínica e laboratorial padronizada para seguimento da atividade da doença, incluindo amostras de sangue e urina para dosagens de anti-DNA, anti-cardiolipina, IgG e IgM, anticoagulante lúpico,

SANTOS, R. S. N.

complemento sérico (C3, C4 e CH50), hemograma e sumário de urina. A maioria dos pacientes estava recebendo tratamento imunossupressor para controle da doença (glicocorticóides e antimaláricos, em associação com azatioprina, ciclofosfamida intravenosa ou micofenolato de mofetila), quando ingressaram no estudo.

Foram coletados dez pacientes que apresentaram mudança no estado do LESJ no período do estudo, pacientes em que houve reativação do LESJ durante o tratamento e pacientes que tinham LESJ ativo e após tratamento apresentaram LESJ inativo. A atividade da doença foi medida através do SLEDAI, que é calculado considerando a presença de manifestações clínicas e achados laboratoriais nos pacientes. Foi considerado LES ativo para crianças com SLEDAI > 4 para e LES inativo para SLEDAI ≤ 4.

Foram coletadas também amostras de crianças e adolescentes saudáveis selecionadas em escolas da cidade do Recife. Foram selecionadas crianças saudáveis pareadas por sexo e idade identificadas sem histórico familiar de doenças autoimunes, especificamente diabetes, lúpus e artrite reumatoide na entrevista com seus genitores, por médico reumatologista, e que assinaram o TCLE concordando com a coleta de sangue periférico.

As amostras de sangue dos pacientes com LESJ e do grupo controle foram encaminhadas e processadas no Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/FIOCRUZ.

3.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos indivíduos com diagnóstico de LESJ (realizado até 18 anos de idade), que possuíam pelo menos uma amostra de sangue coletada no período de atividade e outra no estado inativo da doença. Foram excluídos aqueles que os genitores não concordaram em participar da pesquisa.

SANTOS, R. S. N.

3.4. Procedimentos Laboratoriais.

3.4.1 Processamento da Amostra

O sangue periférico dos pacientes e do grupo de pacientes saudáveis foi colhido em tudo contendo o anticoagulante EDTA e processado pelo gradiente de Ficoll®, reagente que separa os elementos sanguíneos (hemácias, leucócitos e plasma) de acordo com a densidade desses elementos. Os leucócitos foram retirados, suspensos em 1 ml de tampão PBS, contados utilizando câmara de Neubauer e alíquotados em tubos com 5×10^6 células, foram também feitas alíquotas de 1,5mL de plasma e armazenadas a -80°C .

3.4.2 Extração de RNA e síntese de cDNA

A partir das alíquotas das células isoladas foi realizada por meio da lise celular pelo reagente TRIZOL® (Invitrogen, Califórnia – USA), em seguida foi realizada homogeneização com clorofórmio para remoção de proteínas. Após centrifugação, foi retirada fase aquosa e misturada ao isopropanol para precipitação do RNA. Após nova centrifugação, o precipitado de RNA foi lavado com etanol 75% e suspenso com 20 μL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), colocado à temperatura de 55°C por 10 minutos para eliminar estrutura secundária da fita de RNA, e evaporação de qualquer resíduo de etanol.

A transcrição reversa em cDNA foi realizada com a enzima transcriptase reversa MMLV (Invitrogen, Califórnia - USA). Resumidamente, foi preparada uma mistura A com 5 μL de água DEPC, 1 μL de dNTP 10 mM e 1 μL de iniciadores randômicos 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Invitrogen, Califórnia – USA), sendo adicionado 5 μL da amostra de RNA previamente extraído, e aquecido em 65°C por 5 min para desnaturação do RNA, e colocado em gelo para evitar a formação de estrutura secundária. Em seguida, é adicionado o volume contido na mistura B, preparada com 4 μL de tampão 5X, 2 μL de dietildiotreitol (DTT) 0,1M e 1 μL de inibidor de RNase 40 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ e incubado a 37°C por 2 minutos antes de adicionar 1 μL da enzima transcriptase reversa, e depois permanecer por 1 hora e 15 minutos a 37°C .

SANTOS, R. S. N.

3.4.3 Construção do plasmídeo pTA-HLAG5

HLA-G5 é a isoforma solúvel mais estudada e a subclonagem de sequência do mRNA de *HLA-G5* em plasmídeo TA Cloning Vector® (Invitrogen, Califórnia-EUA) permitiu a quantificação da expressão do *HLA-G5* em amostras de cDNA dos pacientes com LESJ utilizando a reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).

3.4.3.1 *Obtenção do fragmento do mRNA de HLA-G5 para clonagem*

Sequências das isoformas de HLA-G depositadas no banco de dados no National Center Biotechnology Information (NCBI) foram pareadas com ferramentas de bioinformática, incluindo o software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA), visando o desenho de iniciadores específicos para ampliação da isoforma *HLA-G5*.

Inicialmente foi realizada PCR para amplificação de segmento gênico em diferentes temperaturas de anelamento, visando identificar as condições da reação com maior especificidade. O fragmento amplificado foi visualizado em gel de agarose 2%, e a banda observada foi cortada. O produto de PCR foi purificado do gel com o reagente *PureLink™ Quick Gel Extraction* (Invitrogen, Califórnia - USA). A qualidade do produto de purificação foi determinada por espectrometria através da relação entre as leituras de ácidos nucleicos aferidas a 260nm e 280nm, sendo considerada boa relação os valores entre 1,8 e 2,0. A sequência foi confirmada por sequenciamento, realizado pelo Núcleo de plataforma tecnológica da FIOCRUZ-PE.

3.4.3.2 *Ligação da sequência HLA-G5 no vetor pTA*

A ligação entre o fragmento de HLA-G5 amplificado chamado inserto e o plasmídeo vetor obtido comercialmente (TA Cloning Vector®, Invitrogen, Califórnia - USA) foi realizada a 16°C, durante 18 horas. A reação de ligação foi preparada com:

SANTOS, R. S. N.

1 μ L do inserto, 2,5 ng/ μ L do vetor, 6 μ L de água, 2 μ L tampão 5x ligase e 0,4 U/ μ L enzima ligase.

3.4.3.3 *Transformação de células bacterianas com o plasmídeo recombinante pTA-HLAG5*

Antes de começar a transformação das células bacterianas, foi necessário tratar a *E. coli* XL1 Blue (bactérias recipientes sensível a ampicilina) com CaCl₂ (100 mM), tornando as células competentes para receber o plasmídeo recombinante. A suspensão de células competentes é distribuída em alíquotas de 200 μ L em microtubos, e armazenada em freezer -80°C até uso. Todos os reagentes e tubos utilizados na preparação de células competentes foram previamente refrigerados com o objetivo de preservar a competência das células.

O protocolo de transformação usado baseia-se na: Adição do produto de ligação em contato com as bactérias competentes em gelo, promovendo a aproximação entre o plasmídeo recombinante e a parede celular da bactéria; choque térmico a 42°C por 30 segundos, visando a abertura dos poros da superfície da bactéria criados durante o processo de competência bacteriana, aumentando a probabilidade de ingresso do plasmídeo nas células; Incubação em gelo por 5 minutos, visando retrair os poros na superfície das células aprisionando o plasmídeo recombinante.

Foram utilizados dois controles para no processo de transformação, em uma das alíquotas de células competentes foi com 10 ng de plasmídeo já utilizado no laboratório e outra alíquota foi mantida sem adição de DNA exógeno, submetidos as mesmas condições de reação da amostra transformada com plasmídeo pTA-HLAG5. Após o choque térmico, as amostras foram acrescidas de 800 μ L de meio líquido LB sem antibiótico e colocadas para crescer a 37°C durante 1 hora, e posteriormente foram semeadas em meio sólido Lurian Bertani (LB) com ampicilina

SANTOS, R. S. N.

3.4.3.4 Seleção de clones recombinantes pela marca de seleção

Os clones bacterianos recombinantes foram selecionados pela capacidade de crescimento no meio LB com ampicilina, visto que apenas as células, que receberam o plasmídeo, têm a capacidade de crescimento em meio com esse antibiótico, pelo fato das células recipientes serem sensíveis ao mesmo.

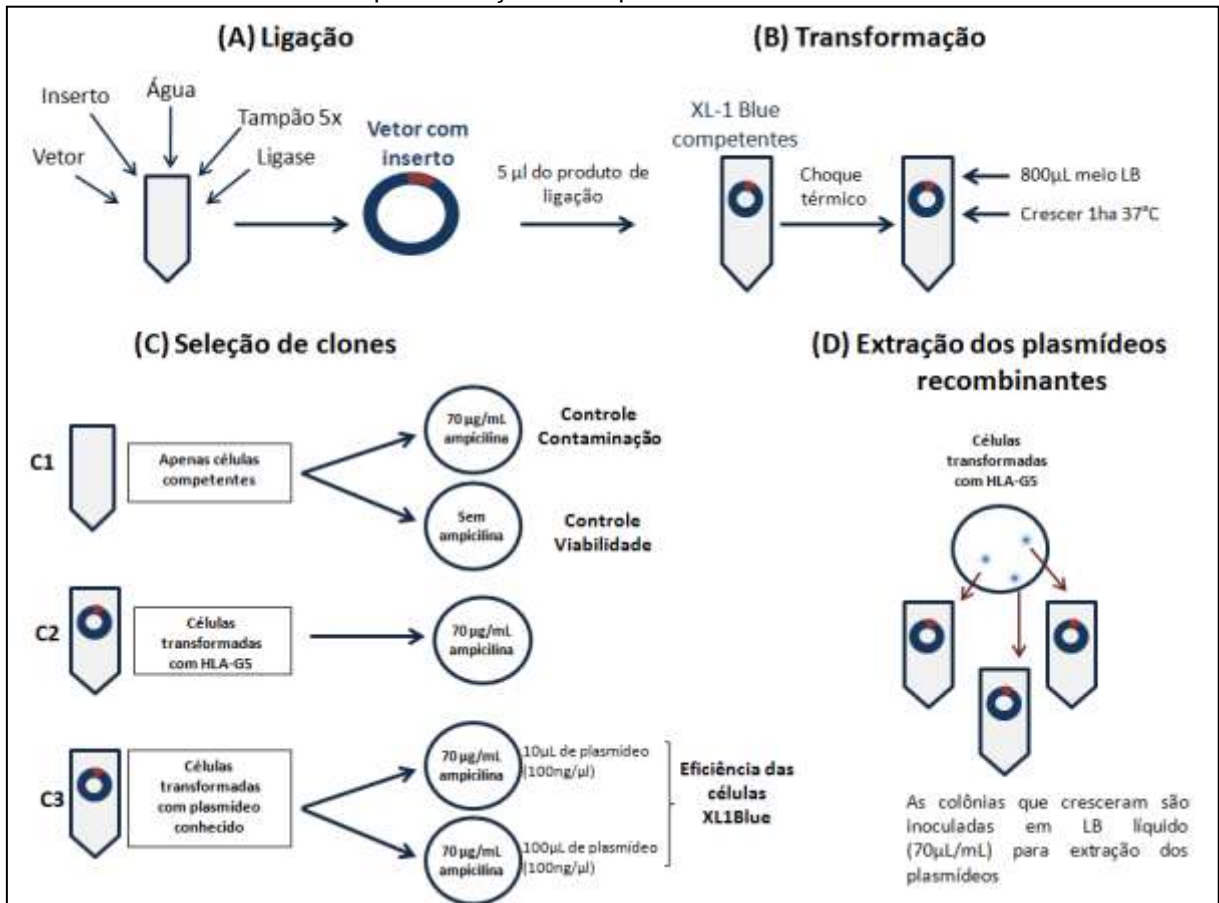
Desta forma, a cultura de células transformadas foram plaqueadas em placas de petri com meio solido LB com ampicilina na concentração de 70µg/mL. A suspensão de células no tubo contendo apenas células competentes foi plaqueada em meio sólido sem antibiótico para avaliação da viabilidade bacteriana, e no meio sólido com antibiótico para confirmar a ausência de contaminação com bactérias resistentes ao antibiótico usado como marca de seleção. (Figura 2C1)

A cultura de células transformadas com concentração conhecida de plasmídeo íntegro foi plaqueada com volume de 10 µL ou 100 µL por placa em meio sólido com antibiótico, visando à avaliação da competência das células recipientes em serem transformadas pelo plasmídeo. (Figura 2C3)

Todo o volume da cultura (1mL) das células competentes transformadas com pTA-HLAG5 foram plaqueadas em quatro placas com meio solido LB com ampicilina (70ug/mL). Após pelo menos 18 horas de incubação a 37°C, as colônias isoladas observadas na placa foram requicadas em meio liquido LB sólido com a mesma concentração de antibiótico, e incubadas a 37°C, para obtenção de colônias isoladas. Cada clone recombinante foi cultivado em meio líquido, sob agitação, por 18 horas para extração de DNA plasmidial e confirmação da presença do inserto. (Figura 2C2)

SANTOS, R. S. N.

Figura 2-Etapas de ligação, transformação e seleção de clones recombinantes que foram utilizados para extração da sequência de *HLA-G5*



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura Esquema do processo de ligação, transformação das células bacterianas, seleção de clones e extração do plasmídeo com o inserto HLA-G5. Em paralelo ao processo de obtenção do plasmídeo contendo o inserto com a sequência de *HLA-G5* foi feito o teste de contaminação das células competentes assim como seu controle de viabilidade (Figura2C1) e também o teste de eficiência dessas células utilizando na transformação plasmídeos já padronizados em uma concentração definida e volumes distintos (Figura2C3).

3.4.3.5 Extração do plasmídeo contendo sequência do gene *HLA-G5*

Bactérias recombinantes foram obtidas a partir de cultura noturna em meio líquido LB submetido à pressão seletiva (presença de ampicilina) através de centrifugação por 5 min, a 4.500 xg. As células foram suspensas em 100 µL de GTE (Glucose 50 mM, Tris 25 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM), acrescido de RNase (0,2 mg/mL) em gelo por 5 min, a posterior adição de 200 µL da solução de NaOH (0,2 M) e SDS (1%) permite a lise das células bacterianas, e desnaturação do DNA cromossomal e plasmidial. Após essa etapa foi colocado 150 µL solução de acetato de potássio (5M) por 10 min no gelo, visando o reanelamento do DNA plasmidial. A

SANTOS, R. S. N.

purificação do DNA plasmidial foi obtida com o acréscimo de um volume aproximado de 500 μ L de fenol-clorofórmio, e a eliminação de restos celulares pela centrifugação por 5 min, a 13.400 xg. O sobrenadante contendo o DNA plasmidial foi transferido para um tubo limpo e submetido à precipitação com 500 μ L de isopropanol e centrifugação a 15 min, a 12.000 g. O precipitado de DNA plasmidial foi lavado com 500 μ L de álcool 70 % e, secado a temperatura ambiente para remoção de resíduo de álcool e suspenso com DEPC.

Após isolamento plasmidial foi realizada nova PCR com mesmos pares de iniciadores utilizados na amplificação do fragmento clonado. Além disso, todos os plasmídeos foram enviados para seqüenciamento utilizando iniciadores na sequência do vetor, e posterior análise bioinformática da sequência obtida.

3.4.3.6 Padronização da PCR em tempo real para detecção de mRNA de HLA-G5

Após obtenção dos plasmídeos desejados, foi necessário testar e estabelecer as condições ideais da PCR em tempo real.

Inicialmente foi realizada PCR quantitativa (qPCR) na temperatura padrão do equipamento (60°C) para testar a especificidade dos *primers* utilizando o sistema de detecção Sybr Green (Applied Biosystem, Califórnia-USA). A melhor temperatura de anelamento *primers*-sequência alvo foi estabelecida a partir dos ensaios com as temperaturas de 60°C, 61°C, 63°C e 65°C. Para verificar o limite de detecção do ensaio, diferentes concentrações do plasmídeos pTA-HLAG5 (100 ng/ μ L; 10 ng/ μ L; 1 ng/ μ L; 0,1 ng/ μ L; 0,01 ng/ μ L) foram testadas em duplicatas na melhor condição de temperatura de anelamento estabelecida

A quantificação absoluta da isoforma de HLA-G5 na amostra clínica foi determinada em relação à quantificação em amostras contendo diluições crescentes e conhecidas de DNA plasmidial determinada em termociclador 7500 da Applied biosystem, cada amostra foi submetida a reação em cadeia para amplificação da isoforma HLA-G5 (posição exon 2-3 + intron 4) em solução tampão da reação contendo SyrBr Green. As condições das PCRs específicas foram: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C seguidos de 40 ciclos de 15 seg a 95°C e 1 min a temperatura de

SANTOS, R. S. N.

anelamento ideal, seguido de 15 ciclos (15 seg a 94°C, 1 min a 60°C, 30 seg a 95 °C e 15 seg a 60 °C) para visualização da Curva de dissociação.

A Curva de dissociação obtida nas qPCRs mostram a especificidade do plasmídeo, onde não há formação de produtos inespecíficos. A curva padrão foi construída através dos dados obtidos, fazendo a relação entre o Ciclo *Threshold* (CT) e a concentração de plasmídeo. Após temperatura de anelamento estabelecida foi feito experimentos diferentes, nas mesmas condições para verificar a reprodutibilidade da reação de PCR, sendo observados os valores do *slope* e da eficiência gerado a partir da equação da reta obtida pelos dados de CT da curva.

3.4.4 Quantificação relativa de mRNA dos genes *IL-10* e *TNF*

A quantificação relativa da expressão de IL-10 e TNF dos pacientes foi feita em comparação ao gene constitutivo *gapdH*, utilizando o sistema de detecção Taqman® (Applied Biosystems, Califórnia - USA).

A expressão relativa (Δ CT) foi determinada pela subtração do CT (da sigla *Cycle threshold*) da curva de amplificação do mRNA do gene IL-10 ou TNF pelo CT obtido na curva de amplificação de mRNA do *gapdH*. CT corresponde ao ciclo em que a curva ultrapassa a linha de *cutoff* determinado experimentalmente.

3.4.5 Detecção do perfil de citocinas

A concentração de citocinas presentes no sangue periférico de crianças com lúpus ativo e inativo foi determinado conforme recomenda o fornecedor do kit *CBA* (*Cytometric Bead Array*, *BD Bioscience*, *San Jose*, *USA*). Os resultados foram expressos em pg/mL. Foram avaliados os perfis Th1 (incluindo INF- γ , TNF e IL-2), Th2 (incluindo IL-10, IL-4), e Th17 (incluindo IL-6, e IL-17).

3.4.6 Detecção do nível de HLA –G solúvel plasmático

O HLA-G solúvel (sHLA-G) foi detectado por imunoenensaio enzimático (ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), utilizando o reagente *sHLA-G detection kit*

SANTOS, R. S. N.

(Exbio, Praga). Uma curva de calibração é construída a partir dos valores resultantes da subtração entre a absorbância obtidas em 450nm por 620nm para as diferentes concentrações das amostras calibradoras. As concentrações das amostras testes são determinadas usando esta curva de calibração.

3.4.7 Análise estatística

A descrição clínica dos casos estudados foi expressa em valor absoluto ou porcentagem, enquanto que as variáveis contínuas (idade e SLEDAI) foram expressas pelo valor máximo, mínimo, e mediana.

A comparação das variáveis entre os grupos com a doença ativa e inativa foi realizada utilizando Mann-Whitney U (quando comparado grupo ativo x inativo) e Kruskal-Wallis (para comparar grupo ativo x inativo x saudável), e a correlação entre os níveis de citocinas e de sHLA-G foram avaliadas utilizando a correlação de Spearman.

Todos os dados e gráficos apresentados foram analisados e construídos utilizando o programa Graph Pad Prism (Califórnia - USA).

SANTOS, R. S. N.

4 RESULTADOS

4.1 Perfil clínico e laboratorial das crianças com lúpus eritematoso sistêmico juvenil

A população de estudo consistiu de 10 pacientes com idades entre 12 e 20 anos (mediana de 14 anos). Desse total 9 pacientes foram do sexo feminino e 6 foram declarados não brancos. Todos os 10 pacientes apresentaram FAN e Anti-dsDNA positivo. Foi observado em metade dos pacientes a presença de lesão renal, úlceras e rash malar, e 4 dos 10 pacientes apresentaram serosite e artrite. (Tabela 1).

Tabela 1-Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com Lúpus eritematoso sistêmico juvenil

Características	N	%
Sexo		
Feminino	9	90
Masculino	1	10
Idade		
Mediana	14	
Mínimo	12	
Máximo	20	
Cor		
Branca	4	40
Não branca	6	60
Alterações clínicas		
Lesão renal	5	50
Serosite	4	40
Artrite	4	40
Úlceras	5	50
Acometimento do SNC	0	
Rash malar	5	50
Hematológicas Imunológicas		
Anti-dsDNA	10	100
FAN	10	100

Fonte: Elaborada pelo autor

Nota: Principais características dos 10 pacientes com LESJ que estudamos. Dentre esses pacientes apenas um deles foram do sexo masculino, apresentaram mediana de 14 anos. Lesão renal, úlceras e rash malar foi clinicamente observado em 5 dos pacientes, entre os dados laboratoriais todos eles apresentaram os autoanticorpos Anti-dsDNA e FAN.

O LESJ nos pacientes foi classificado em ativo ou inativo de acordo com o valor de SLEDAI calculado no momento da coleta da amostra. O índice de atividade

SANTOS, R. S. N.

do LES (SLEDAI) variou entre 0-4, com mediana de 2 para os pacientes inativos e entre 8-27, com mediana de 13 para pacientes ativos (Tabela 2).

Tabela 2-Valores de SLEDAI do grupo de pacientes com LESJ ativo e inativo

SLEDAI	Ativo	Inativo
Mediana	13	2
Mínimo	8	0
Máximo	27	4

Fonte: Elaborada pelo autor

Nota: No grupo de pacientes com LESJ ativo e inativo foi observado o valor máximo, mínimo e a mediana dos valores de SLEDAI, no grupo de amostras de pacientes com o LESJ ativo o SLEDAI máximo é 27 enquanto que no grupo de amostras de pacientes inativos esse valor chega apenas a 4.

4.2 Obtenção da sequência do mRNA do *HLA-G5* após subclonagem

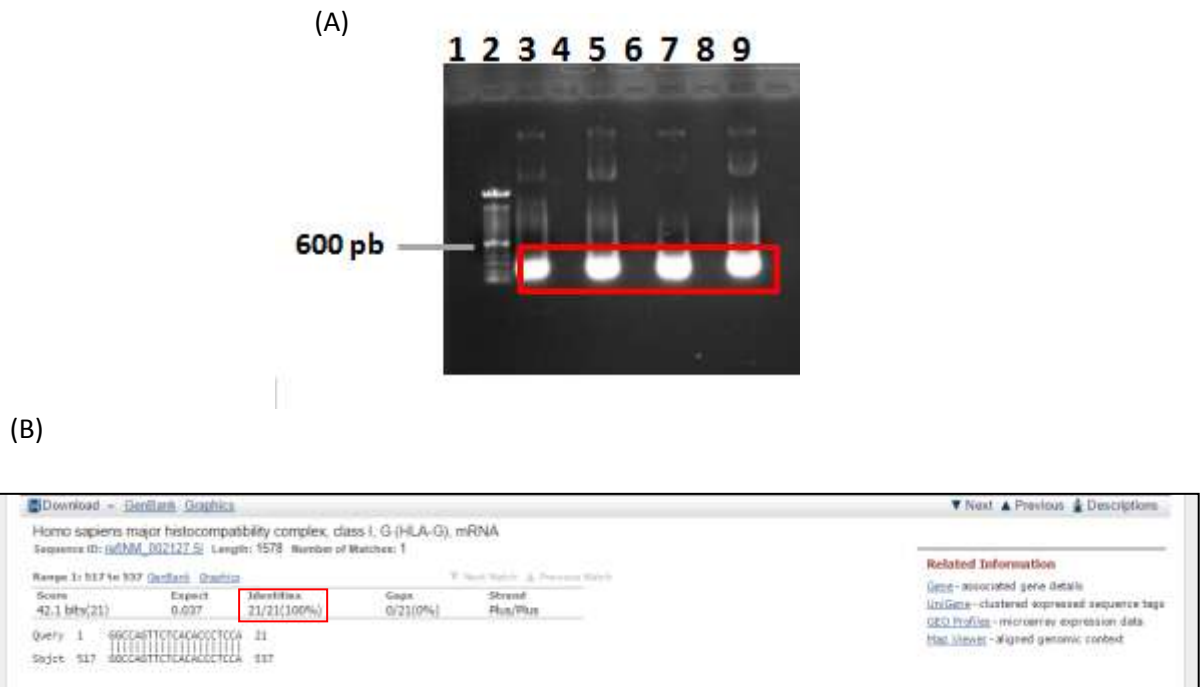
No princípio não foi possível desenhar os *primers* a fim de isolar, amplificar e subclonar todas as isoformas do HLA-G para utilizar em nosso trabalho, pois depois de alguns experimentos foi observado através de sequenciamento que as outras isoformas apresentavam homologia com outro tipo de HLA, sendo assim, a única isoforma que conseguimos isolar e analisar foi a HLA-G5.

Através de estudo de bioinformática utilizando a sequência de RNA mensageiro referência de HLA-G (NM_002127.5) foi desenhado o *primer* que amplifica a região entre a junção do éxon 2-3 e o Intron 4 capaz de amplificar a sequência de HLA-G5, amplificando o fragmento de 347 pares de bases (pb), que foi excisado, purificado, subclonado e sequenciado. (Figura 3A)

Após a obtenção do plasmídeo da isoforma HLA-G5 foi realizada nova PCR utilizando os primers da isoforma para observação da amplificação da sequência em gel de agarose 2%, o produto da amplificação também foi enviado para sequenciamento, e com o resultado confirmamos sua de homologia com a isoforma do HLA-G5 através de um BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) realizado entre a sequência subclonada e a sequência referência encontrada no NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Figura 3B).

SANTOS, R. S. N.

Figura 3-Análise de clones recombinantes para a confirmação da subclonagem da sequência da isoforma HLA-G5.



Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: (A) Gel de agarose 2% mostrando o produto de amplificação da sequência HLA-G5 a partir de DNA de diferentes clones, Poço 2 – Peso molecular de 100 pares de bases; 3,5,7 e 9 – Clones com inserto HLA-G5; 1, 4, 6 e 8 – poços vazios (B) Sequência referência de HLA-G usada para obter sequência que foi utilizada na subclonagem.

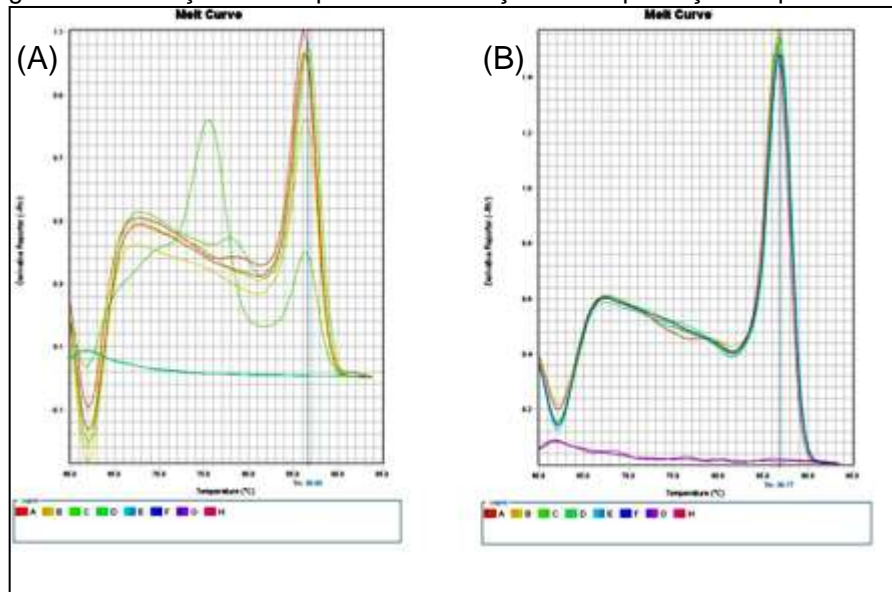
4.3 Padronização da PCR quantitativa (qPCR) para quantificação de HLA-G5 no pacientes com LESJ

A amplificação da sequência de HLA-G5 a diferentes temperaturas e concentrações do plasmídeo pTA-HLA-G5 permitiu a determinação do threshold e da construção da curva padrão, que foi utilizada para quantificar a produção de mRNA nos pacientes com LESJ.

A amplificação do pTA-HLAG5 utilizando a temperatura de anelamento de 63°C mostrou diferentes picos no gráfico da curva de dissociação, enquanto que a reação realizada a 65°C apresentou pico único, considerado específico para a amplificação de HLA-G5 nas condições estabelecidas (Figura 4).

SANTOS, R. S. N.

Figura 4-Otimização da temperatura da reação de amplificação do pTA-HLAG5



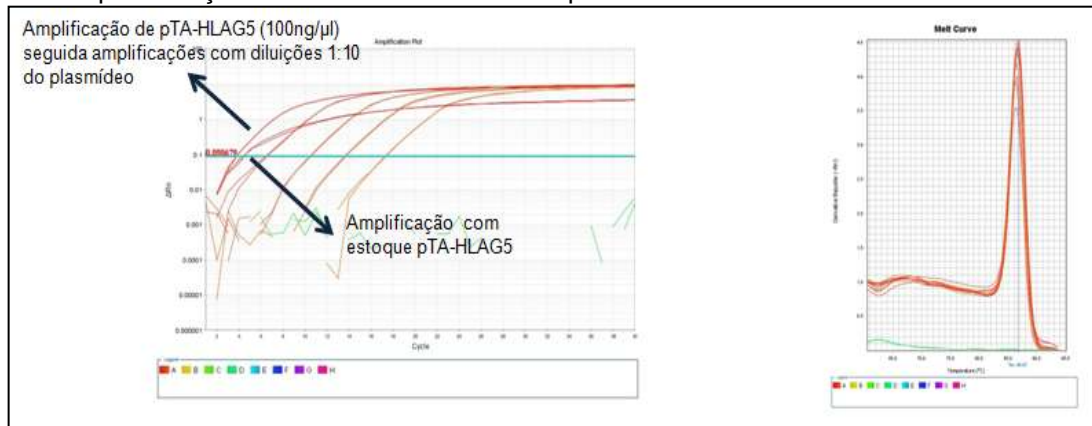
Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: Curva de dissociação da amplificação do pTA-HLAG5 por qPCR utilizando a temperatura de anelamento de 63°C (A) e 65°C (B).

Após definição da temperatura de anelamento, foram analisadas diferentes concentrações do pTA-HLAG5 para definir quais concentrações de plasmídeo seriam utilizadas na construção da curva padrão. A concentração de 100 ng/mL de pTA-HLA-G5 e, pelo menos, 5 amostras de diluições de 10x foram definidas como adequadas; concentrações maiores que 100ng/mL apresenta sinais gráficos na curva de amplificação compatíveis com inibição da reação (Figura 5).

SANTOS, R. S. N.

Figura 5-Teste de diferentes concentrações de pTA-HLAG5 para construção da curva padrão utilizada na quantificação de mRNA de HLA-G5 nos pacientes com LESJ.



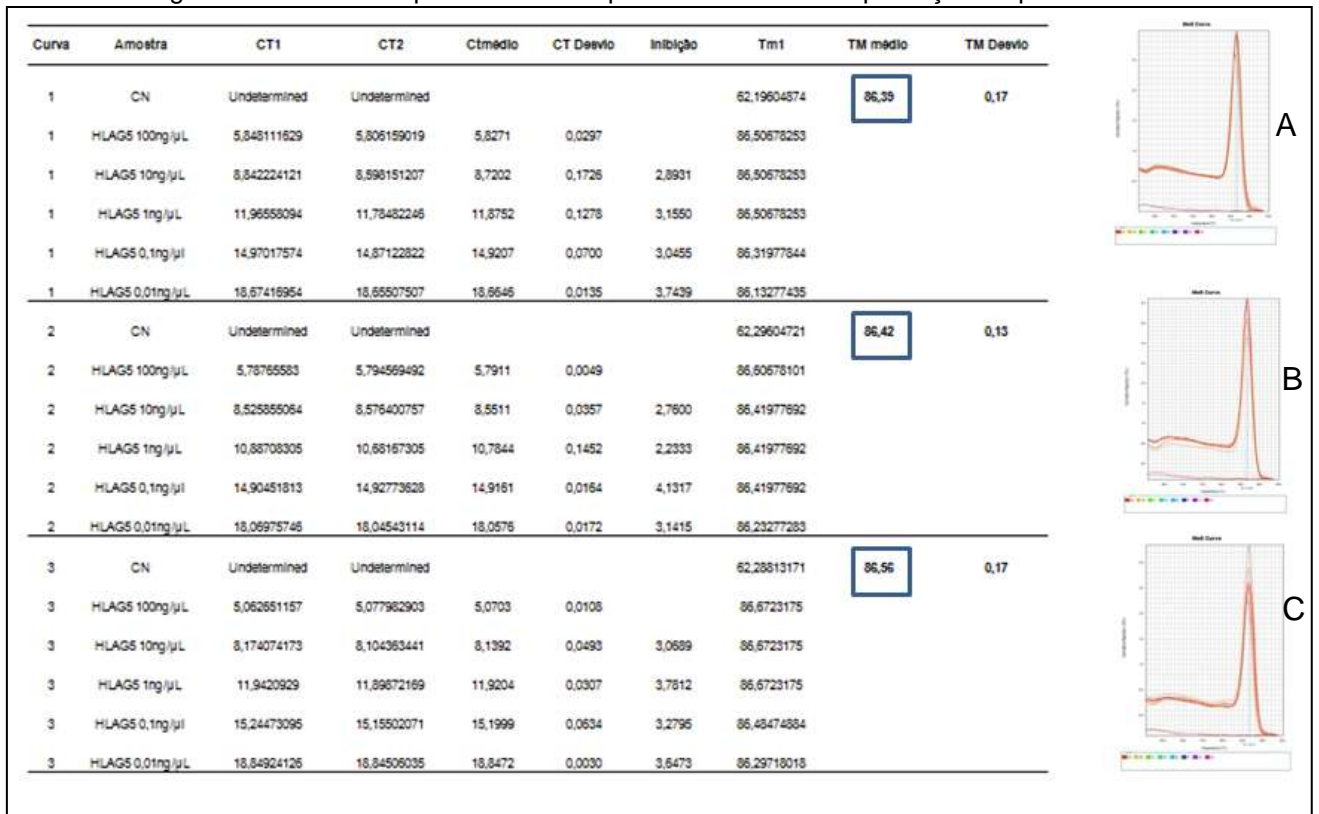
Fonte: Elaborada pelo autor

Lenda: (A) Curvas de amplificação utilizando como material alvo o pTA-HLAG5 extraído, na curva foi observado o plasmídeo na concentração estoque, na concentração de 100ng/μL, 10 ng/μL, 1 ng/μL, 0,1 ng/μL e 0,01 ng/μL. (B) Curva de dissociação resultante da amplificação comprovando a especificidade da reação mesmo em concentrações de material alvo distintas.

A reprodutibilidade da reação foi testada em três experimentos distintos, com amostras em duplicatas, considerando a temperatura de anelamento de 65°C e a concentração inicial do pTA-HLAG5 de 100ng/μL. Primeiro foram analisados os três experimento de maneira distinta, observando inicialmente o TM e a ausência de picos inespecíficos na curva de dissociação, e depois calculando a inclinação da curva para cada experimento. Considerando um desvio padrão, o TM da curva de dissociação nos três experimentos variou de 86,22 a 86,73 °C, e em nenhum experimento foi observado picos inespecíficos adicionais (Figura 6).

SANTOS, R. S. N.

Figura 6-Análise da especificidade e reprodutibilidade da amplificação do pTA-HLAG5



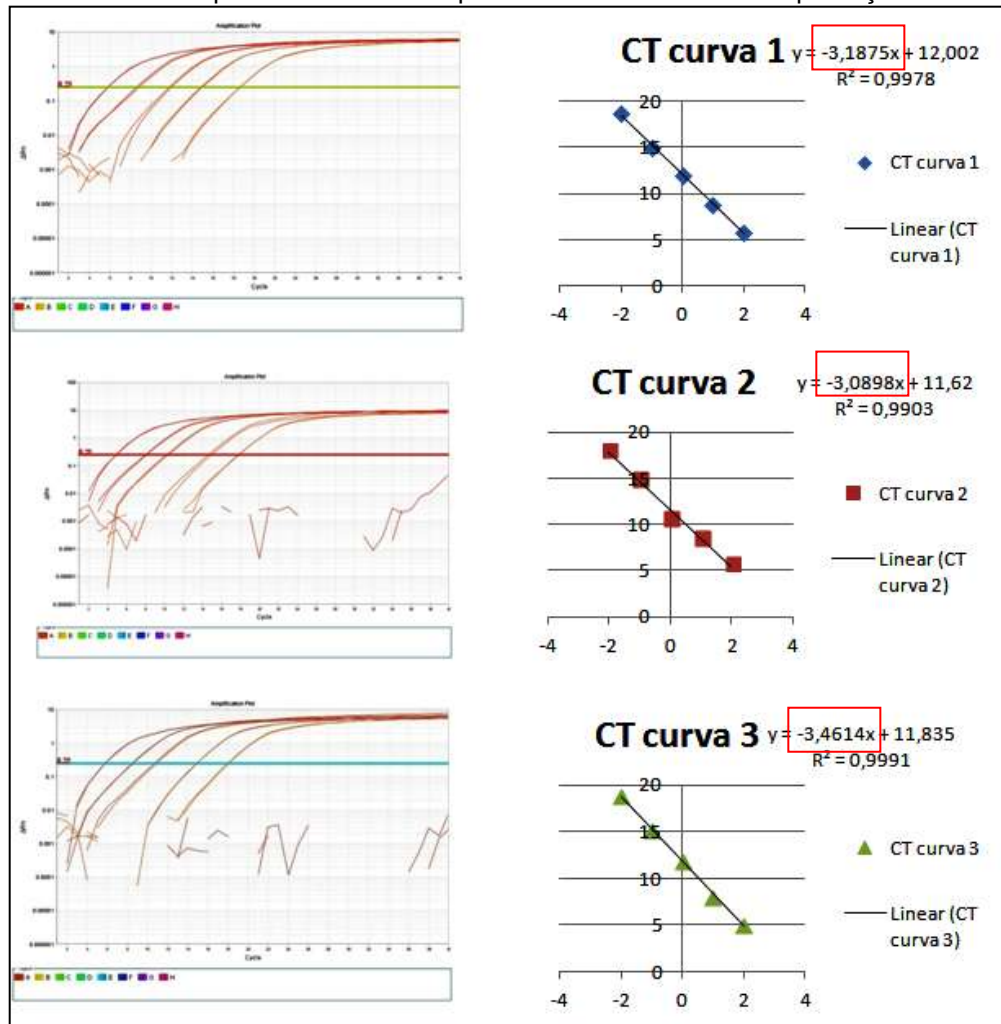
Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: Temperatura Média (TM) dos três experimentos analisadas separadamente. No experimento (A) 86,39°C, (B) 86,42 °C e (C) 86,56 °C, além da temperatura mostrar a especificidade de cada reação é visto o pico único na curva de dissociação de cada experimento.

A curva padrão dos três experimentos mostrou significância de 0,99%, com inclinação da reta de -3,1, -3,2 e -3,5, sugerindo boa reprodutibilidade (Figura 7).

SANTOS, R. S. N.

Figura 7-Amplificação de cada experimento utilizando as mesmas concentrações de plasmídeo e a curva padrão construída a partir dos dados de cada amplificação.



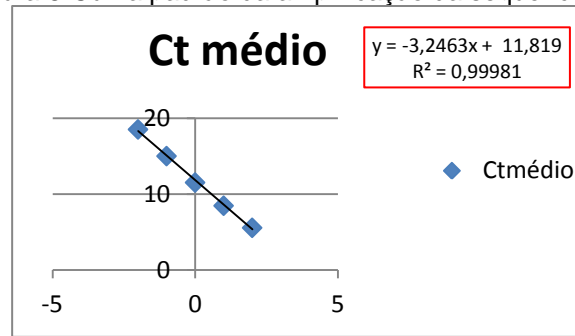
Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: Na curva de cada experimento foi destacada a inclinação da curva, mostrando resultado próximo à -3,3 que era esperado, pois a diluição é feita de 1:10 e log de 10 na base 2 é igual a 3,3. Também pode ser observado o R^2 que indica a eficiência da reação e quanto mais próximo de 1 mais a reação foi eficiente

A mesma análise foi realizada com todos os dados das concentrações dos experimentos em conjunto (Figura 8). Considerando os três experimentos, a inclinação da curva padrão foi de -3,24, sendo confirmada a reprodutibilidade e a boa eficiência dos experimentos.

SANTOS, R. S. N.

Figura 8-Curva padrão da amplificação da sequência HLA-G5



Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: Curva padrão construída a partir dos resultados das qPCRs realizadas utilizando o plasmídeo de HLA-G5 como controle positivo. Na equação da reta é possível observar o valor de R^2 (0,99) e da inclinação da curva (- 3,24) mostrando a reprodutibilidade das reações.

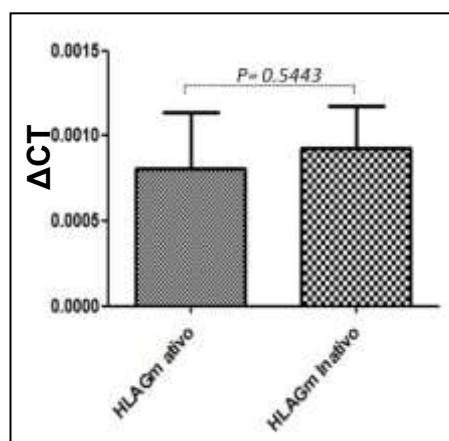
4.4 Relação entre atividade do LESJ e índices de HLA-G e citocina

4.4.1 Relação entre expressão do mRNA do HLA-G5, IL-10 e TNF e a atividade do LESJ

Foram analisadas amostras de 10 pacientes com LESJ, em dois momentos distintos, isto é, quando a doença estava clinicamente ativa e inativa. Inicialmente foram analisados a expressão de mRNA de HLA-G5, IL-10 e TNF.

O mRNA da isoforma HLA-G5 através da qPCR (Figura 9). A expressão de mRNA de HLA-G5 não apresentou diferença significativa entre os pacientes com LESJ clinicamente ativo e inativo ($p=0,544$).

Figura 9-Relação entre a quantificação de mRNA do HLA-G5 em pacientes com LESJ ativo e inativo



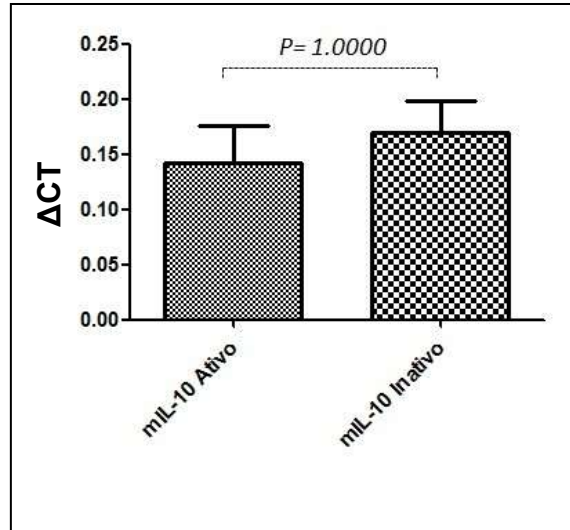
Fonte: Elaborada pelo autor

A análise comparativa da expressão de mRNA da IL-10 entre os grupos com LESJ ativo e inativo não apresentou diferença significativa, sugerindo possível

SANTOS, R. S. N.

regulação pós-transcricional na sua expressão, traduzida no aumento da estabilidade do mRNA na doença ativa, ou aumentando da degradação do mRNA de IL-10 no estado inativo (Figura 10).

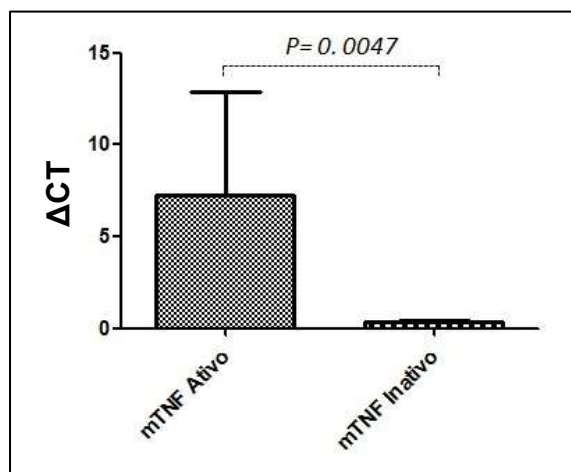
Figura 10-Comparação de mRNA do gene *IL-10* entre os grupos com LESJ ativo e inativo



Fonte: Elaborada pelo autor

Apesar do pequeno número de pacientes estudados e a grande variação na expressão de TNF houve diferença estatística em relação à síntese de mRNA em relação a síntese de mRNA dos pacientes ativos e inativos ($p=1.000$) (Figura 11).

Figura 11-Comparação de mRNA do gene *TNF* entre os grupos com LESJ ativo e inativo



Fonte: Elaborada pelo autor

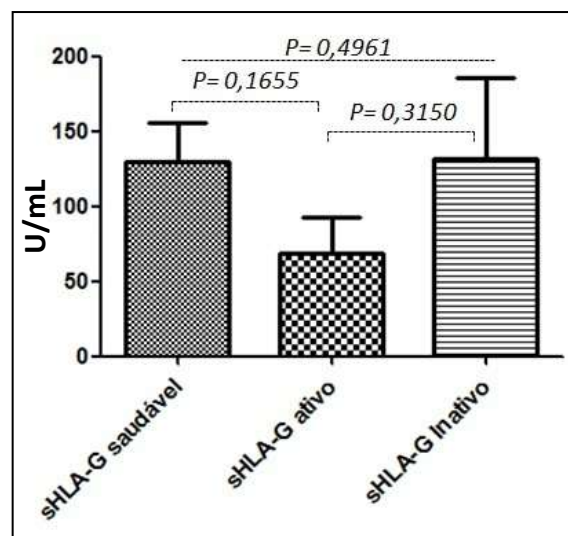
SANTOS, R. S. N.

4.4.2 Presença do sHLA-G e do perfil de citocinas Th1, Th2 e Th17 e sua relação com a atividade do LESJ

Quando analisados os níveis de sHLA-G (isoformas HLA-G1s/HLA-G5) foi observada uma tendência a diminuição de sHLA-G na forma ativa do LESJ, mas não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos saudável, ativo e inativo, possivelmente devido ao número reduzido de pacientes e a grande variação das amostras (Figura 12).

A maior variação no nível das proteínas HLA-G nos estados ativo e inativo da doença associado à mesma expressão do mRNA de HLA-G5, sugere a necessidade de avaliar se no estado ativo ocorre de fato uma redução da forma solúvel HLA-G1, que não foi avaliada por qPCR.

Figura 12-Relação entre os valores de HLA-G em sua forma solúvel entre pacientes com LESJ ativo, inativo e indivíduos saudáveis.

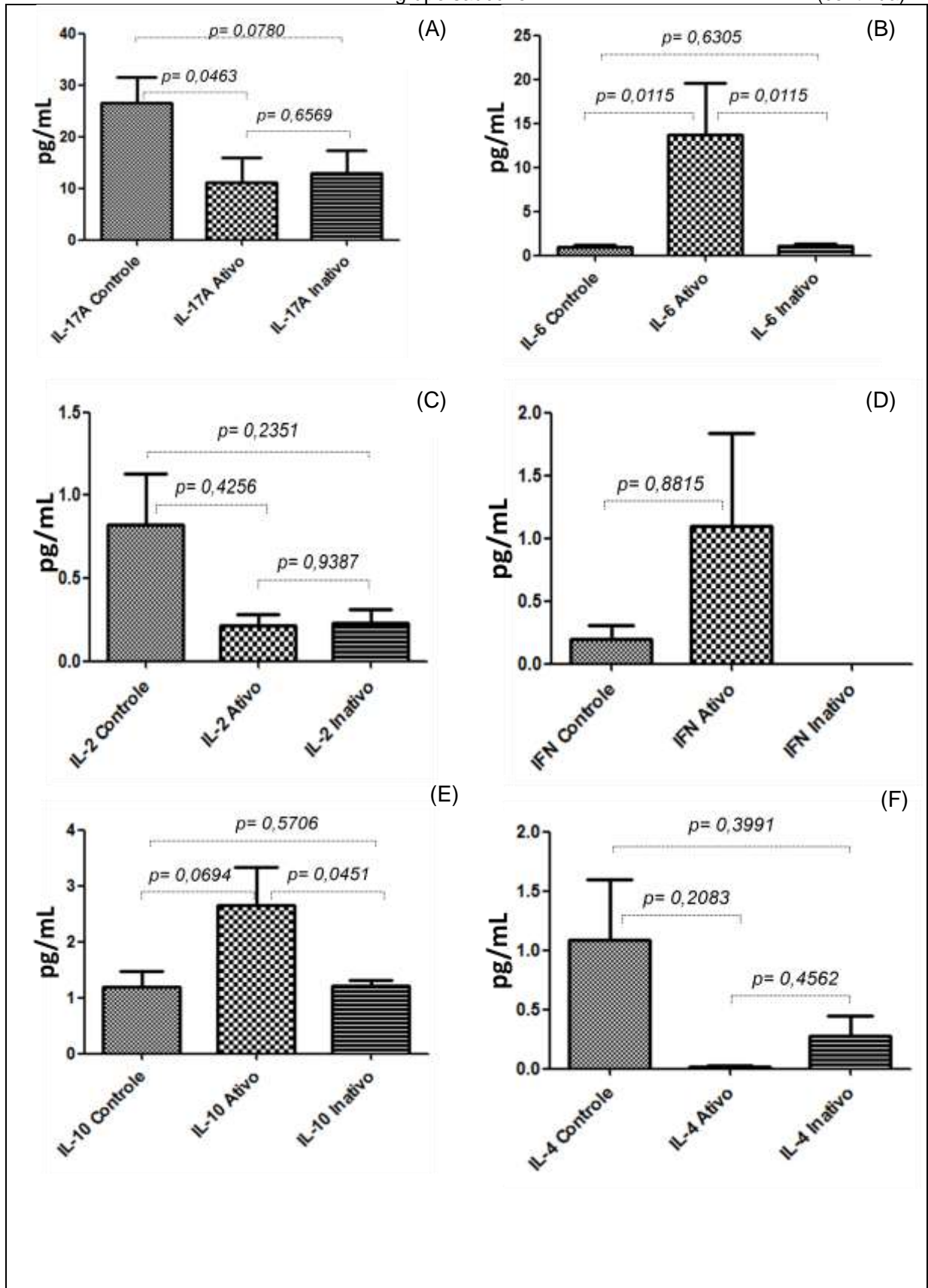


Fonte: Elaborada pelo autor

Para avaliar o perfil de resposta imune dos pacientes, foi feita a comparação entre os valores das citocinas IL-10, IFN γ , IL-4, IL-6, IL-2, TNF e IL-17 nos pacientes com LESJ ativo e inativo, e indivíduos saudáveis (Figura 13).

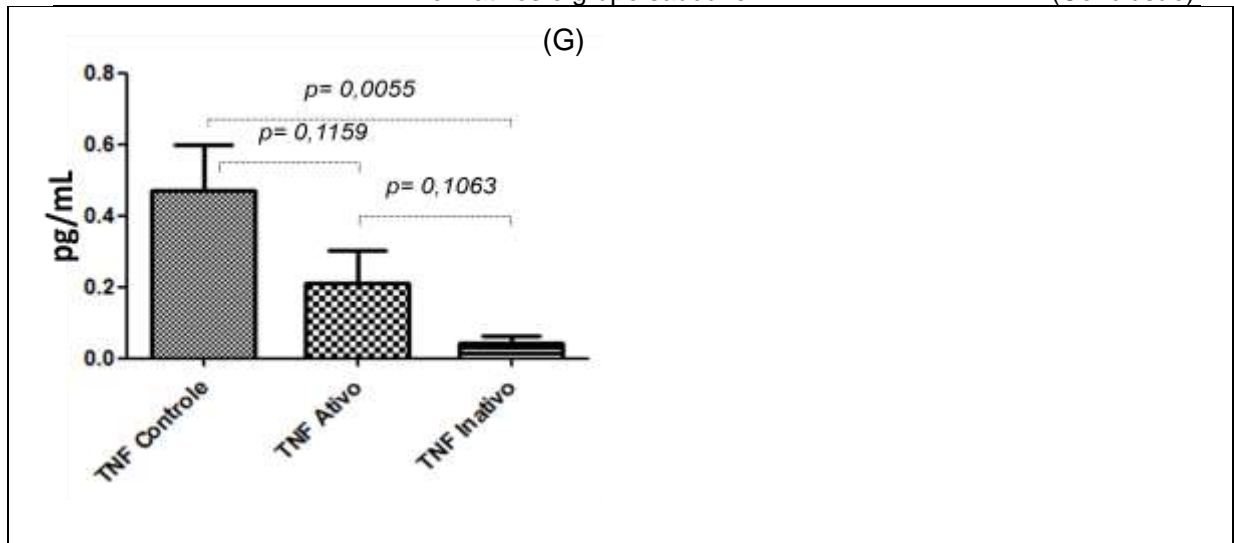
SANTOS, R. S. N.

Figura 13. Comparação dos níveis das citocinas entre os grupos de pacientes ativos e inativos e grupo saudável (continua)



SANTOS, R. S. N.

Figura 13-Comparação dos níveis das citocinas entre os grupos de pacientes ativo e inativos e grupo saudável (Conclusão)



Fonte: Elaborada pelo autor

O valor de IL-17A do grupo de crianças saudáveis aparece significativo em relação ao LESJ ativo ($p=0.046$), mas não apresentou diferença estatística em relação ao grupo de LESJ inativo ($p=0.078$) e as amostras não variaram com a atividade do LESJ ($p=0.656$) (Figura 13A).

O valor de IL-6 em pacientes com LESJ ativo foi significativamente maior do que o valor detectado quando esses pacientes estavam com a doença controlada (inativa) com imunossupressor e em relação às crianças saudáveis ($p=0.011$). A diferença entre os níveis plasmáticos de IL-6 em crianças saudáveis e crianças com LESJ inativo não foi estatisticamente diferente ($p=0.630$) (Figura 13B).

Não foi possível quantificar o nível plasmático IFN γ nas amostras do grupo de pacientes com LESJ inativo, a quantidade da proteína não ultrapassou o limite de detecção. Entre o grupo controle e pacientes com LESJ ativo não houve diferença significativa ($p=0.881$) (Figura 13D).

A diferença entre os níveis de IL-10 nos pacientes com LESJ ativo em comparação com o grupo das crianças com LESJ inativo foi estatisticamente significativa ($p=0.045$), quando comparado o grupo ativo com o controle foi visto uma tendência à diminuição do grupo controle, mas não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0.069$) (Figura 13E).

Os dados mostram que apenas entre o grupo controle e o grupo com LESJ inativo foi observada diferença estatisticamente significativa ($p=0.005$), os níveis

SANTOS, R. S. N.

plasmáticos de TNF apresentam-se diminuídos; e que, apesar da diferença de expressão protéica na doença ativa e inativa não ter sido significativa ($p=0,106$), houve diferença estatística em relação a síntese de mRNA. (Figura 13G).

4.5 Correlação entre sHLA-G e citocinas no LESJ ativo e inativo

A partir dos valores de expressão protéica de sHLA-G e das citocinas no grupo dos pacientes com LESJ ativo e inativo foi feita a correlação de Spearman. (Tabela 3). Os valores de $p < 0,05$ mostram as correlações estatisticamente significativas.

Tabela 3-Correlações entre HLA-G solúvel e citocinas nos grupos de crianças com LESJ ativo e inativo

LESJ	Correlação de Spearman							Valor de p						
	IL-17A	IFN	TNF	IL-10	IL-6	IL-4	IL-2	IL-17A	IFN	TNF	IL-10	IL-6	IL-4	IL-2
LESJ Inativo														
IL-17A														
IFN														
TNF	0,080							0,826						
IL-10	0,648		-0,054					0,043		0,883				
IL-6	0,477		-0,118	0,814				0,164		0,745	0,004			
IL-4	0,748		0,117	0,868	0,807			0,013		0,748	0,001	0,005		
IL-2	0,612		0,056	0,649	0,362	0,413		0,060		0,878	0,042	0,305	0,235	
sHLA-G	-0,200		0,265	-0,148	0,123	-0,222	-0,076	0,580		0,458	0,682	0,735	0,538	0,834
LESJ Ativo														
IL-17A														
IFN	0,357							0,311						
TNF	0,418	0,620						0,230	0,056					
IL-10	0,194	0,651	0,436					0,591	0,041	0,208				
IL-6	0,482	0,337	0,012	0,028				0,158	0,342	0,975	0,938			
IL-4	-0,351	-0,222	-0,071	-0,269	0,065			0,320	0,538	0,844	0,453	0,859		
IL-2	0,765	-0,028	0,244	0,123	0,569	-0,160		0,010	0,939	0,497	0,735	0,086	0,658	
sHLA-G	0,484	-0,148	0,212	-0,183	0,584	-0,107	0,801	0,157	0,683	0,557	0,613	0,076	0,768	0,005

Fonte: Elaborada pelo autor

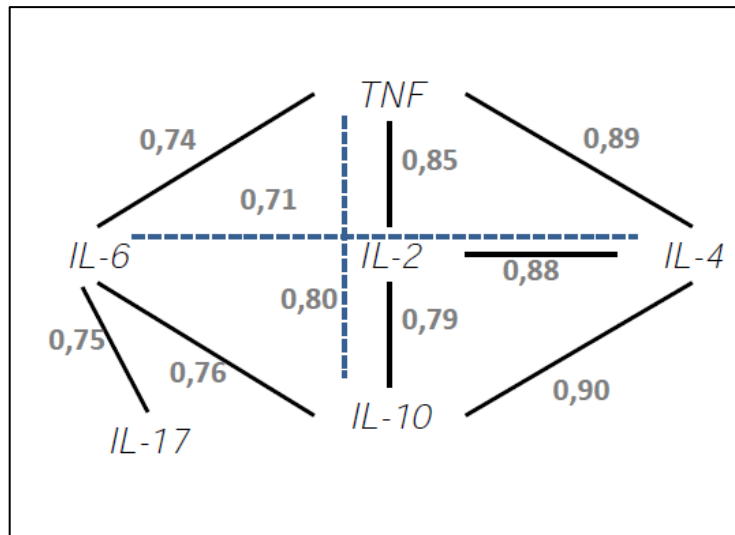
Legenda: Tabela mostrando a correlação entre as diferentes citocinas e sHLA –G e mostrando o valor da força que uma exerce sobre a outra, em todos os casos da tabela elas exercem uma força positiva. Na parte de cima da tabela, estão marcadas em rosa as correlações significativas do grupo com LESJ inativo e na parte de baixo estão marcadas em azul as correlações significativas do grupo com LESJ.

Há a diminuição das forças de relação entre as citocinas, e perda do padrão de correlação das citocinas IL-10, IL-2 e IL-4 no estado ativo da doença, e ainda no estado ativo há perda do padrão em quase todas citocinas sendo predominante a força de relação entre a IL-17, IL-2 e IFN γ , havendo também a presença da relação com sHLA-G sugerindo que a perda do balanço entre as citocinas é um mecanismo

SANTOS, R. S. N.

envolvido na ativação da doença, apesar de não está claro o modelo de ativação mediada por essas citocinas no presente estudo, foi desenhado três modelos com o objetivo de ilustrar como se encontra o balanço das citocinas no estado ativo, inativo e no grupo saudável. (Figuras 14, 15 e 16).

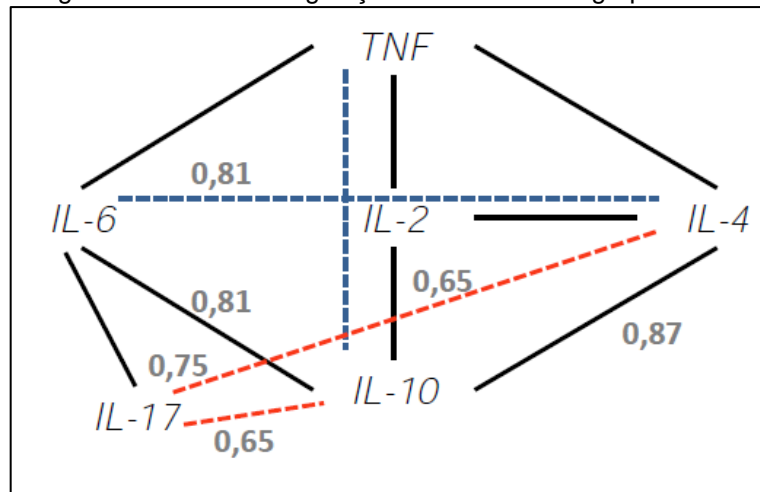
Figura 14-Modelo da regulação de citocinas no grupo controle



Fonte: Elaborada pelo autor

Nota: A partir dos valores da Correlação de Spearman foi desenhado um modelo teórico de como estaria sendo feito o balanço de equilíbrio das citocinas no estado saudável, havendo homeostasia imunológica.

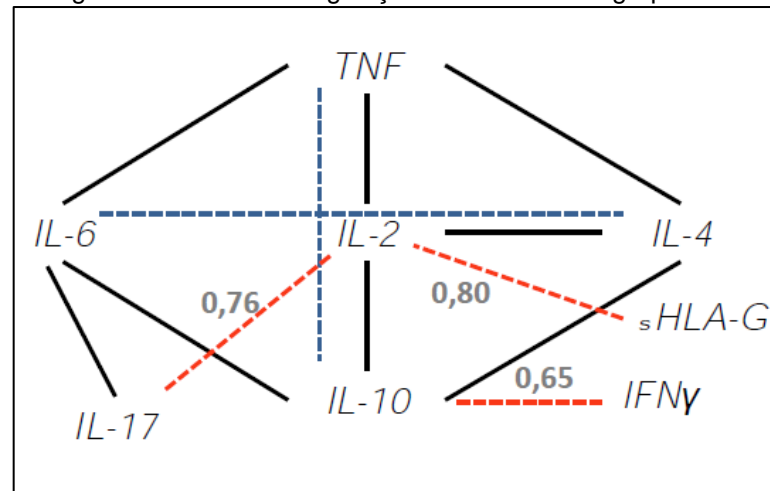
Figura15-Modelo de regulação de citocinas no grupo inativo



Fonte: Elaborada pelo autor

Nota: No modelo desenhado para o grupo inativo observa-se a interação da IL-17 com a IL-4 e a IL-10, o que não foi observado no modelo controle. É sugerido também a forte influência da IL-10, pois apresenta interação com todas as outras citocinas com força de interação distinta em cada uma delas.

Figura 16-Modelo de regulação de citocinas no grupo ativo



Fonte: Elaborada pelo autor

Nota: No modelo teórico ativo a IL-17 apresenta relação com a IL-2 e a IL-10 com o IFN γ que não foi observado nos modelos do grupo controle e do grupo inativo. Nesse modelo é visto a perda de homeostasia entre todo o conjunto de citocinas e a presença de interação do sHLA-G na resposta.

SANTOS, R. S. N.

5 Discussão

Em crianças, a atividade do lúpus medida pelo valor do SLEDAI aparentemente está associada a menor produção das isoformas solúveis HLA-G1/G5 no plasma. O que concorda com o estudo de Rizzo et al., (2008) que mostram maiores níveis de HLA-G solúvel em pacientes saudáveis em relação à pacientes adultos com lúpus. E ao estudo de Luque et al., 2006 que mostraram o aumento dos valores de HLA-G solúveis durante o curso do tratamento imunossupressor de pacientes que foram submetidos a transplante de coração. O interessante é o fato de que o nível de mRNA da isoforma solúvel HLA-G5 na doença ativa e inativa são semelhantes, mas o nível das isoformas solúveis HLA-G1 e -G5 em conjunto estão diminuídas na forma ativa da doença em relação a forma inativa e também em crianças saudáveis. Isso pode indicar que na doença ativa exista uma diminuição importante da isoforma HLA-G1, ou regulação pós-transcricional levando a degradação das isoformas solúveis HLA-G5, e -G1.

Há controvérsias na literatura sobre a influência entre HLA-G e IL-10. Em crianças com LESJ, a expressão de IL-10 está significativamente aumentada na doença ativa, onde encontramos uma diminuição na expressão de sHLA-G (não significativa, possivelmente devido a amostragem), mas não encontramos uma correlação inversa como mostrado por Rosado et al. (2008) que demonstraram que IL-10 e HLA-G5 trabalham de forma conjunta, um induzindo a produção do outro em modelo murino com lúpus, a administração contínua de anticorpos anti-IL-10 em pacientes com lúpus cutâneo atrasa o início da autoimunidade, e melhora lesões cutâneas e sintomas articulares (ROSADO et al., 2008), mesmo encontrando níveis significativos de altos de sHLA-G no modelo com LES em relação ao controle, não encontrou correlação entre o sHLA-G e o IL-10 e SLEDAI, assim como em nosso estudo também não observamos essas correlações.

A citocina IL-6 está envolvida no desenvolvimento de células B e na produção de proteínas de fase aguda, e tem sido encontrada em altos níveis em pacientes com lúpus em relação ao grupo controle (CLARK, et al., 2013), a semelhança do nosso trabalho que encontrou diferenças significativas nos níveis de IL-6 no grupo com lúpus ativo em relação ao grupo com lúpus inativo e ao saudável. Talaat et al.

SANTOS, R. S. N.

(2015) também encontraram diferença significativa entre os níveis de IL-6 em pacientes com LES e artrite reumatóide em relação ao grupo saudável, e uma correlação entre níveis de IL-6 e IL-23. No presente estudo, o nível da citocina IL-23 não foi avaliado, mas no estado inativo de LESJ observamos a correlação positiva entre IL-6 e IL-10.

Recentemente, foi demonstrada a relação entre o aumento de níveis séricos TNF e o aumento no SLEDAI, sugerindo que o TNF pode ser utilizado como biomarcador para a atividade do lúpus (POSTAL et al., 2013). Em nosso estudo foi observado maior quantidade de mRNA de TNF no grupo com doença ativa quando comparado com inativo, mas a detecção proteica foi muito baixa, e muitas vezes indetectável, o que pode ser explicado pelo limite de detecção do método utilizado para dosagem, ou o rápido *turnover* da citocina.

Crianças com LESJ inativo possuem menor produção de IL-2, IL-4, IL-6 e IL-17A em relação a crianças saudáveis, mas o que chama atenção é ao aumento significativo de IL-17A, IL-6 e IL-4 no soro das crianças quando há reativação da doença, porque é sabido que a IL-6 induz a diferenciação em resposta Th17, com o aumento da produção de IL-17A responsável pela resposta inflamatória e recrutamento de células efetoras nos órgãos alvos (CRISPIN et al., 2010), contudo, no nosso modelo de correlação a IL-17A apresentou apenas relação com IL-4 no estado inativo da doença. Não detectamos associação entre IL-17A com TNF e IL-6 como mostrado por Talaat et al. (2015), que também observou a redução de IFN γ associada com a elevação nos níveis de IL-6 e IL-17A. No modelo apresentado, a IL-4 no estado inativo da doença guardar correlação com todas as citocinas avaliadas numa força menor do que as demais correlações, com exceção da correlação com IL-17A, que foi de 1.0, mas na doença ativa a IL-4 reduz a influência sobre outras citocinas, passando a apenas apresentar correlação com a TNF e IL-17A, duas citocinas pró-inflamatórias, relacionadas a lesão tecidual e a persistência da inflamação, respectivamente. Em relação a IL-2, sabe-se que ela está envolvida no processo de ativação e proliferação de células T, e em pacientes com lúpus ela encontra-se diminuída (CRISPIN et al., 2010); contudo, comparando níveis plasmáticos de IL-2 no mesmo paciente no estado ativo e inativo da doença não encontramos diferença estatisticamente significativa nem quando comparamos os

SANTOS, R. S. N.

níveis da citocina em relação a crianças com doença ativa e crianças saudáveis, sugerindo que a alteração na proliferação de células T talvez seja consequência e não causa direta das disfunções regulatórias das células T no lúpus.

Outra citocina relacionada com a modulação das funções de células T no lúpus é o IFN γ , mas ainda não há consenso sobre o modo de regulação exercida pela citocina. O estudo de correlação das citocinas apresentado sugere que a ativação clínica do lúpus envolve o aumento da resposta pró-inflamatória exercida pelo IFN γ . Evidências em modelos murinos mostram que lúpus induzido por IFN γ está relacionado com o envolvimento de diversos órgãos e produção de anticorpos anti-Sm e anti-DNA (JACOB; STOHL, 2011). Dolff e colaboradores (2011) também mostraram a elevada produção de IFN γ em células T de pacientes com LES quando comparado com controles saudáveis, mas a diminuição do IFN γ em pacientes com LES também foi reportada (TALAAT et al., 2015).

SANTOS, R. S. N.

6 CONCLUSÃO

Em nosso estudo foi possível observar a diminuição na expressão de HLA-G solúvel (sHLA-G5/HLA-G1) nos pacientes com LESJ ativo em relação ao estado inativo da doença nos mesmos pacientes e também no grupo saudável, mas sem significância estatística. Entretanto, exclusivamente na forma ativa da doença, níveis plasmáticos de sHLA-G apresentou correlação positiva com níveis de IL-2, e esse com níveis de IL-17A, confirmando a relação entre resposta imunológica do perfil Th17 e patogênese do lúpus.

Esse estudo foi muito importante para mostrar a mudança do perfil de citocinas durante a ativação da doença lúpica em crianças; teve como desenho a avaliação dos mesmos indivíduos em dois momentos de acordo com a ativação da doença, o que permitiu evitar a possível influência da variabilidade genética típica de estudos de caso-controle, por outro lado teve a limitação de amostragem, visto que esses pacientes na maioria entraram no estudo com doença inativa, já em tratamento, sendo a ativação da doença uma ocorrência não desejável e não esperada. Contudo, mesmo com um número reduzido, foi possível caracterizar a perda do balanço de citocinas com a ativação da doença, e desenhar experimentos futuros para aprofundar o modelo de regulação imunológica no LESJ ativo.

SANTOS, R. S. N.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunologia Celular e Molecular. 7. ed. São Paulo: Elsevier, 2012.

ALONSO, M. D. et al. Systemic lupus erythematosus in northwestern Spain. Medicine, Barcelona, v. 90, n. 5, p. 350-358, 2011

AMUR, S.; PAREJH, A.; MUMMANENI, P. Sex differences and genomics in autoimmune diseases. Journal of Autoimmunity, London, v.38, p. 254-265, 2012

ARINGER, M.; SMOLEN, J. S.; SLE - Complex cytokine effects in a complex autoimmune disease: tumor necrosis factor in systemic lupus erythematosus. Arthritis Research and Therapy, London, v. 5, n. 4, p. 172-177. 2003.

BARCELLOS, L. F. et al. High-density SNP screening of the major histocompatibility complex in Systemic Lupus Erythematosus demonstrates strong evidence for independent susceptibility regions. PLoS Genetics, San Francisco, v. 5, n. 10, p. 1-10, 2005.

BEZERRA. E. L. M. et al., Systemic Lupus Erythematosus (SLE): Clinical and laboratory profile of patients followed at the Onofre Lopes University Hospital (UFRN-Natal/ Brazil) and early organ damage in patients with recently diagnosed disease. Revista Brasileira de Reumatologia, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 339-342, 2005

BRUNNER, H. I. et al. Sensitivity of the systemic lupus erythematosus disease activity index, british isles lupus assessment group index, and systemic lupus activity measure in the evaluation of clinical change in childhood-onset systemic lupus erythematosus. Arthritis and Rheumatism, Atlanta, v. 42, n. 7, p. 1354-1360, 1999.

BRUNNER, H. I. et al., Difference in disease features between childhood-onset and adult-onset systemic lupus erythematosus. Arthritis and Rheumatism, Atlanta, v. 58, n. 2, p. 556-562, 2008.

CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G: from biology to clinical benefits. Trends in Immunology, Oxford, v. 29, n. 3, p. 125-132, 2008a.

CAROSELLA, E. D. et al. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. Blood, Washington, v. 111, p. 4862-4870, 2008b.

CONDE, S. R. S. S. et al., Estudo clínico-epidemiológico de pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico, em uma população da Amazônia oriental. Revista Paraense de Medicina, Belém, v. 23, n. 2, p. 1-5, 2009.

SANTOS, R. S. N.

CONSIGLIO, C. R. et al. Association of the HLA-G gene +3142C>G polymorphism with systemic lupus erythematosus. Tissue Antigens, Oxford, v. 77, n. 6, p. 540-545, 2011.

COOPER, G. S. et al., Occupational and environmental exposures and risk of systemic lupus erythematosus: silica, sunlight, solvents. Rheumatology, Oxford, v. 49, p. 2172-2180, 2010.

CRISPÍN, J. C. et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. Trends in Molecular Medicine, Oxford, v. 16, n. 2, p. 47-57, Feb. 2010.

CROW, M. K. Collaboration, genetics associations and lupus erythematosus. The New England Journal of Medicine, Boston, v. 358, n. 9, p. 956-960, 2008

DANCHENKO, N.; SATIA, J. A.; ANTHONY, M. S. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden. Lupus, London, v. 15, p. 308-318, 2006.

D'CRUZ, D. P.; KHAMASHTA, M. A.; HUGHES, G. R. V. Systemic lupus erythematosus. Lancet, London, v. 369, p. 587-596, 2007

DI CRISTOFARO, J. et al. HLA-G haplotype structure shows good conservation between different populations and good correlation with high, normal and low soluble HLA-G expression. Human Immunology, New York, v. 74, p. 203-206, 2013.

DONADI, E. A., et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. Cellular and Molecular Life Sciences, Basel, v. 68, p. 369-395, 2011

DOREAU, A. et al. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. Nature Immunology, New York, v. 10, n. 7, p. 778-785, Jul. 2009

FARID, T. M. et al. Association of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with juvenile systemic lupus erythematosus nephritis in a cohort of Egyptian patients. Iranian Journal Kidney Disease, Teheran, v. 5, n. 6, p. 392-397, Nov. 2011

FLOWER, C. et al. Systemic lupus erythematosus in an African Caribbean population: incidence, clinical manifestations, and survival in the Barbados National Lupus Registry. American College of Rheumatology, Hoboken, v. 64, n. 8, p. 1151-1158, 2012

FONT, J. et al. Systemic Lupus Erythematosus (SLE) in childhood: analysis of clinical and immunological findings in 34 patients and comparison with SLE characteristics in adults. Annals of the Rheumatic Disease, London, v. 57, n. 8, p. 456-459, 1998

FUNAUCHI, M. et al. Serum level of interferon-gamma in autoimmune diseases. The Tohoku Journal Experimental Medicine, Tokyo, v. 164, n. 4, p. 259-267, Aug. 1991

SANTOS, R. S. N.

GAFFNEY, P. M. et al. A genome-wide search for susceptibility genes in human systemic lupus erythematosus sib-pair families. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America, Washington, v. 95, n. 25, p. 14875-14879, Dec. 1998

HAGIWARA, E. et al. Disease severity in patients with systemic lupus erythematosus correlates with an increased ratio of interleukin-10:interferon-gamma-secreting cells in the peripheral blood. Arthritis and Rheumatism, Atlanta, v. 39, n. 3, p. 379-385, Mar. 1996

HARLEY, I. T. W. et al. Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. Nature Reviews. Genetics, London, v. 10, n. 5, p. 285-290, 2009

HOUSSIAU, F. A. et al. Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. Lupus, Houndmills, v. 4, n. 5, p. 393-395, Oct. 1995

HUSSAIN, N. HLA Association in SLE patients from Lahore-Pakistan. Bosnian journal of basic medicine sciences, Sarajevo, v. 11, n. 1, p. 20-26, 2011

INVERNIZZI, P. et al. Female predominance and X chromosome defects in autoimmune diseases. Journal of Autoimmunity, London, v. 33, p. 12-16, 2009

JAMES, J. A. et al. An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. The journal of clinical investigation, New Haven, v. 100, n. 12, p. 3019-3026, 1997

JAKES, R. W. et al. Systematic review of the epidemiology of systemic lupus erythematosus in the Asia-Pacific region: prevalence, incidence, clinical features and mortality. Arthritis Care and Research, London, v. 64, n. 2, p. 159-168, 2012.

JOHANNESON, B. et al. A major susceptibility locus for systemic lupus erythematosus maps to chromosome 1q31. American Society of Human Genetics, Chicago, v. 71, n. 5, p. 1060-1071, Nov. 2002

KAISER, R.; CRISWELL, L. A. Genetics research in systemic lupus erythematosus for clinicians: methodology, progress, and controversies. Current Opinion in Rheumatology, Philadelphia, v. 22, n. 2, p. 119-125, 2010

KARIMABAD, M. N. et al. Is the IL-10 promoter polymorphism at position -592 associated with immune system-related diseases? Inflammation, New York, v. 36, n. 1, p. 35-41, Feb. 2013.

KAMMER, G. M. et al. Abnormal T cell signal transduction in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism, Atlanta, v. 46, n. 5, p. 1139-1154, 2002.

SANTOS, R. S. N.

KICHUL, K. O. et al. Genetic ancestry, serum Interferon- α activity, and autoantibodies in systemic lupus erythematosus. The Journal of Rheumatology, Toronto, v. 39. n. 6, p. 1238-a240.

KLEIN-GITELMAN, K.; REIFF, A.; SILVERMAN, E. D. Systemic lupus erythematosus in childhood. Rheumatic Disease Clinics of North America, Philadelphia, v. 28, p. 561-577, 2002.

LEE, H. S.; BAE, S. C. What can we learn from genetic studies of systemic lupus erythematosus? Implications of genetic heterogeneity among populations in SLE. Lupus, London, v. 19, p. 1452-1459, 2010

LÓPEZ, P.; GUTIÉRREZ, C.; SUÁREZ, A. IL-10 and TNF alpha genotypes in SLE. Journal Biomed Biotechnology, Cairo, v. 2010. 2010.

LUCENA-SILVA, N. et al. HLA-G 3'Untranslated region polymorphisms are associated with Systemic Lupus Erythematosus in 2 brazilian populations. Journal of Rheumatology, Toronto, v. 40, p. 1104-1113, 2013.

LUQUE, L. et al. Soluble HLA-G in Heart transplantation: Their relationship to rejection episodes and immunosuppressive therapy. Human Immunology, New York, v. 67, p.257-263, 2006.

MAIDHOF, W.; HILAS, O. Lupus: Na overview of the disease and management options. Pharmacy and Therapeutics, Yardley, v. 37, n. 4, p. 240-249, 2012.

MARTINEZ-LASO, J. et al. Promoter sequences confirm the three diferente evolutionary lineages described for HLA-G. Human Immunology, New York, v. 74, p. 383-388, 2013.

MINA, R.; BRUNNER, H. I. Pediatric Lupus – Are there differences in presentation, genetics, response therapy, damage accrual compared to adult lupus? Rheumatic Disease Clinics of North America, Philadelphia, v. 36, n. 1, p. 53-80, 2010.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annual Review Immunology, Palo Alto, v. 19, p. 683-765. 2001

MOSAAD, Y. M. HLA-DRB1*15 confers susceptibility to juvenile SLE but in not associated with disease presentation: An egyptian study. Immunological investigations, London, v. 39, n. 3, p. 235-244, 2010.

MOTA, L. M. H. et al., Lúpus induzido por drogas - Da imunologia básica à aplicada. Revista Brasileira de Reumatologia, São Paulo, v. 47, n. 6, p. 431-437, 2007.

NAKASHIMA, C.A. K. et al. Incidenceandclinical-laboratory aspects of systemic lúpus erythematosus in a southern brazilian city. Revista Brasileira de Reumatologia, São Paulo, v. 51, n. 3, p. 231-239, 2011

SANTOS, R. S. N.

PARK, Y. B. et al. Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. Clinical and Experimental Rheumatology, Piza, v. 16, n. 3, p. 283-288, May/Jun. 1998

POSTAL, M.; APPENZELLER, S. The role of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Cytokine, San Diego, v. 56, n. 3, p. 537-543, Dec. 2011

PENNELL, L. M.; GALLIGAN, C. L.; FISH, E. N. Sex effects immunity. Journal of Autoimmunity, London, v. 38, n. 2-3, p. 282-291, 2012

PETRI, M. Sex hormones and systemic lupus erythematosus. Lupus, London, v. 17, p. 412-415, 2008.

PIRRI, A. et al. A study of HLA-G polymorphism and linkage disequilibrium in renal transplant patients and their donors. Transplant Immunology, Dunto Green, v. 20, n. 3, p. 143-149, 2009

PONS-ESTEL, G. J. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. Seminars in Arthritis and Rheumatism, Maryland Heights, v. 39, n. 4, p. 257-278, 2010.

QUINTERO, O. L. et al. Autoimmune disease and gender: Plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity. Journal of Autoimmunity, London, v. 38, p. 109-119, 2012.

RAHMAN, A., ISENBERG, D.A., Systemic lupus erythematosus. The New England Journal of Medicine, Boston, v. 358 n.9, p. 929-939, 2008

REIVELLE, J. D. et al., Restriction fragment length polymorphism analysis of HLA-DR, DQ, DP and C4 alleles in Caucasians with systemic lupus erythematosus. The Journal of Rheumatology, Toronto, v. 18, n. 1, p. 14-18, 1991.

REKVIG, O. P. et al. Autoantibodies in lupus: Culprits or passive bystanders? Autoimmunity Reviews, Amsterdam, v. 11, n. 8, p. 596-603, 2012.

REVEILLE, J. D. et al. Systemic Lupus Erythematosus in three ethnic Groups. The effects of HLA class II, C4, and CR1 alleles, socioeconomic factors, and ethnicity at disease onset. Arthritis and Rheumatology, Hoboken, v. 41, n. 7, p. 1161-1172, 1998.

RIZZO, R. et al. HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus: HL-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. Tissue Antigens, Oxford, v. 71, p. 520-529, 2008.

SANTOS, R. S. N.

ROSADO, S. et al. Expression of human leukocyte antigen-G in systemic lupus erythematosus. Human Immunology, New York, v. 69, p. 9-15, 2008.

ROSSEAU, P. et al. The 14 pb deletion-insertion polymorphism in the 3'UTR region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. Human Immunology, New York, v. 9, p. 11520-11525, 2003.

RUBTSOV, A. V. et al. Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity. Autoimmunity Reviews, Philadelphia, v. 9, p. 494-498, 2010.

SAUMA, M. F. C. S.; NUNES, N. A. C.; LOPES, L. F. M. Retrospective analysis of clinical and laboratorial aspects of 104 Systemic Lupus Erythematosus (SLE) patients in Belém, PA, Brazil (1990-1999). Revista Brasileira de Reumatologia, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 192-197, 2004.

SHERER, Y. et al. Autoantibody explosion in Systemic Lupus Erythematosus: More than 100 different antibodies found in SLE patients. Seminars in Arthritis and Rheumatism, Philadelphia, v. 34, n. 2, p. 501-537, 2004.

SILVA, C. A.; AVCIN, T.; BRUNNER, H. I. Taxonomy for Systemic Lupus Erythematosus with onset before adulthood. Arthritis Care and Research, Hoboken, v. 64, n. 12, p.1787-1793, 2012

SMITH, P. P.; GORDON, C. Systemic lupus erythematosus: Clinical presentations. Autoimmunity reviews, Philadelphia, v.10, p.43-45, 2010

SOUZA, A. W. S. et al. Sistema Imunitário-Parte II O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade. Revista Brasileira de Reumatologia, São Paulo, v. 50, n. 6, p. 665-694, 2010.

TALAAT, R. M. et al. Th1/Th2/Th17/ Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. Cytokine, Philadelphia, v. 72, n. 2, p. 146-153, 2015

TEDESCHI, S. K.; BERMAS, B.; COSTENBADER, K. H. Sexual disparities in the incidence and course of SLE and RA. Clinical Immunology, Orlando, v. 149, n. 2, p. 211-218, 2013.

TSAO, B. P. The genetics of human systemic lupus erythematosus. Trends in Immunology, Oxford, v. 24, n. 11, p. 595-602, 2003.

UETRECHT, J. Current trends in drug – induced autoimmunity. Autoimmunity Reviews, Amsterdam, v. 4, n. 5, p. 309-314, 2005.

SANTOS, R. S. N.

VARGAS, K. S.; ROMANO, M. A. Lupus Eritematoso Sistemico: Aspectos epidemiológicos e diagnóstico. Revista Salus-Guarapuava, Paraná, v. 3, n. 1, p. 79-94, 2009

WAHREN-HERLENIUS, M.; DORNER, T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. Lancet, London, v. 382, n. 9894, p. 819-831, 2013

WALSH, S. J.; GILCHRIST, A. Geographical clustering of mortality from systemic lupus erythematosus in the United States: contributions of poverty, hispanic ethnicity and solar radiation. Lupus, London, v. 15, p. 662-670, 2006

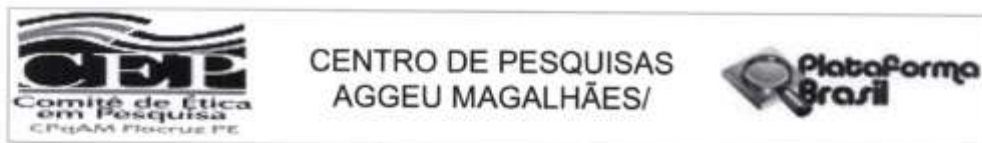
WHITACRE, C. C. Sex differences in autoimmune disease. Nature Immunology, New York, v. 2, n. 9, p. 777-780, 2001.

WU, J. Y.; YEH, K. W.; HUANG, J. L. Early predictors of outcomes in pediatric lupus nephritis: Focus on proliferative lesions. Seminars in Arthritis and Rheumatism, Philadelphia, v. 43, n. 4, p. 513-520, 2014.

ZANDMAN-GODDARD, G.; PEEVA, E.; SHOENFELD, Y. Gender and autoimmunity. Autoimmunity Reviews, Amsterdam, v. 6, p. 366-372, 2007.

SANTOS, R. S. N.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DO CENTRO DE PESQUISA AGGEU MAGALHÃES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do polimorfismo do HLA-G em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e artrite idiopática juvenil

Pesquisador: André de Souza Cavalcanti

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 02400512.2.3001.5190

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 593.986-0

Data da Relatoria: 01/08/2012

Apresentação do Projeto:

O presente trabalho tem o propósito de estudar o polimorfismo do gene HLA-G no lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ), na artrite idiopática juvenil (AIJ) e em seus familiares.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVOS Fase I ∩ Identificar os sítios polimórficos presentes no gene HLA-G

3.1 Determinar as freqüências alélicas e genotípicas de polimorfismos do gene HLA-G em pacientes com diagnóstico de LESJ, AIJ e controles saudáveis não-relacionados e indivíduos relacionados geneticamente.

3.2 Avaliar possível associação das freqüências alélicas, genotípicas e haplótipos dos sítios polimórficos do gene HLA-G encontrados com o desenvolvimento de LESJ e AIJ.

3.3 Avaliar possível associação das freqüências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos sítios polimórficos do gene HLA-G encontradas em pacientes com LESJ e correlacionar com manifestações clínicas da doença, atividade, dano cumulativo e terapia utilizada.

- Avaliar possível associação das freqüências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos sítios polimórficos do gene HLA-G encontradas em pacientes com AIJ e correlacionar com subtipos de AIJ, manifestações clínicas e laboratoriais da doença e terapia utilizada.

3.5 Investigar a origem familiar do polimorfismo e a possível associação com casos graves.

Fase II ∩

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº		CEP: 50.670-420
Bairro: Cidade Universitária		
UF: PE	Município: RECIFE	
Telefone: (81)2101-2639	Fax: (81)2101-2639	E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br

SANTOS, R. S. N.



Continuação do Parecer: 593.986-0

Investigar a expressão de diferentes isoformas de HLA-G na LESJ e AIJ

- Determinar o nível de expressão de HLA-G em plasma de pacientes ao diagnóstico, durante a fase controlada da doença e em episódios de reativação clínica através da quantificação de mRNA usando iniciadores específicos para amplificação de cada isoforma.
- Avaliar a expressão de isoformas de HLA-G através de técnicas imunológicas, incluindo western blot, ELISA, citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais.
- Investigar a associação de tipo e níveis de expressão de diferentes isoformas de HLA-G com quadros graves e reativação da doença.
- Determinar o perfil de resposta imune nas fases aguda e controlada da doença e relacionar com o nível e tipo de isoforma de HLA-G presente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco mínimo associado a coleta de sangue. Por exemplo: dor no local e pequeno hematoma.

Benefícios:

Os benefícios relacionados ao estudo constam em saber se o paciente com LESJ ou AIJ possui um tipo de alteração no gene HLA-G que predispõe o desenvolvimento da doença. A descoberta de que tipo de gene HLA-G está associado com o desenvolvimento dessas duas doenças reumatológicas nos leva a um melhor esclarecimento dessas doenças. Tema inédito na literatura. Após o término da pesquisa será fornecido informações ao paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto com grande relevância científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou todos os documentos exigidos.

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há

Situação do Parecer:

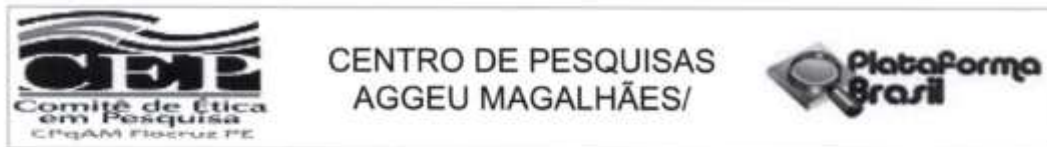
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº		CEP: 50.670-420
Bairro: Cidade Universitária		
UF: PE	Município: RECIFE	
Telefone: (81)2101-2639	Fax: (81)2101-2639	E-mail: comiteetica@cpqam.focruz.br

SANTOS, R. S. N.



Continuação do Parecer: 593.986-0

Considerações Finais a critério do CEP:

Endosso a decisão de aprovação emitido pelo CEP da UFPE.

RECIFE, 11 de Abril de 2014

Assinador por:
Janaina Campos de Miranda
(Coordenador)

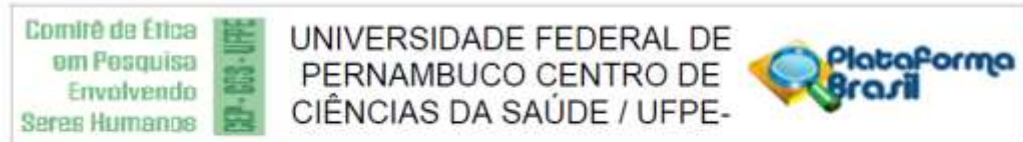
Janaina Campos de Miranda
Pesquisadora em Saúde Pública
Coordenadora
Mat. SIAPE 464777
CEP / CPqAM / FIOCRUZ

Este parecer reemitido substitui o parecer número 593986 gerado na data 10/04/2014 08:07:16, onde o número CAAE foi alterado de 02400512.2.0000.5208 para 02400512.2.3001.5190.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br

SANTOS, R. S. N.

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do polimorfismo do HLA-G em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico juvenil e artrite idiopática juvenil

Pesquisador: André de Souza Cavalcanti

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 02400512.2.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 510.151

Data da Relatoria: 11/12/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda ao protocolo em epígrafe cujo propósito é incluir o Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) como instituição coparticipante para coleta de dados.

A pesquisa visa estudar o polimorfismo do gene HLA-G no lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) e na artrite idiopática juvenil (AIJ) e em seus familiares. HLA-G é uma molécula do MHC de classe I não clássica ou do grupo Ib, com múltiplas propriedades imunoregulatórias. Devido a sua ação imunossupressora, sua expressão tem sido sugerida como possível mecanismo de proteção contra resposta inflamatória autoimune.

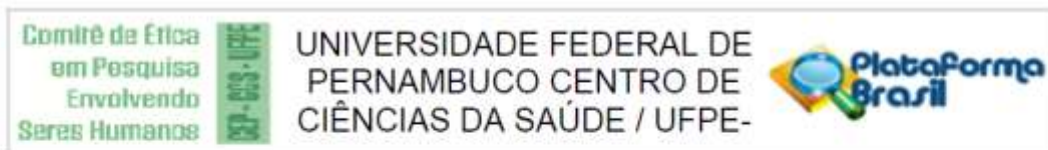
A expressão do HLA-G em doenças inflamatórias e autoimunes é uma área relativamente recente de pesquisa. A proposta consiste basicamente em um estudo experimental com 200 pacientes: 100 portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico Juvenil e 100 portadores de Artrite Idiopática Juvenil visando estabelecer uma correlação entre o gene HLA-G e suas variantes com estas patologias, a ser desenvolvida em duas fases.

Objetivo da Pesquisa:

Na Fase I a pesquisa tem por objetivo identificar os sítios polimórficos presentes no gene HLA-G e,

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

SANTOS, R. S. N.



Continuação do Parecer: 510.151

por objetivos específicos: 1) determinar as frequências alélicas e genotípicas de polimorfismos do gene HLA-G em pacientes com diagnóstico de LESJ, AIJ e controles saudáveis não-relacionados e indivíduos relacionados geneticamente; 2) avaliar possível associação das frequências alélicas, genotípicas e haplótipos dos sítios polimórficos do gene HLA-G encontrados com o desenvolvimento de LESJ e AIJ; 3) avaliar possível associação das frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos sítios polimórficos do gene HLA-G encontradas em pacientes com LESJ e correlacionar com manifestações clínicas da doença, atividade, dano cumulativo e terapia utilizada; 4) avaliar possível associação das frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos sítios polimórficos do gene HLA-G encontradas em pacientes com AIJ e correlacionar com subtipos de AIJ, manifestações clínicas e laboratoriais da doença e terapia utilizada e, 5) investigar a origem familiar do polimorfismo e a possível associação com casos graves.

Na Fase II, a pesquisa tem por objetivo investigar a expressão de diferentes isoformas de HLA-G na LESJ e AIJ e, por objetivos específicos: 1) determinar o nível de expressão de HLA-G em plasma de pacientes ao diagnóstico, durante a fase controlada da doença e em episódios de reativação clínica através da quantificação de mRNA, usando iniciadores específicos para amplificação de cada isoforma; 2) avaliar a expressão de isoformas de HLA-G através de técnicas imunológicas, incluindo western blot, ELISA, citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais; 3) investigar a associação de tipo e níveis de expressão de diferentes isoformas de HLA-G com quadros graves e reativação da doença; 4) determinar o perfil de resposta imune nas fases aguda e controlada da doença e relacionar com o nível e tipo de isoforma de HLA-G presente.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos aos quais os sujeitos de pesquisa estarão expostos estão relacionados à coleta de sangue (dor no local e pequeno hematoma).

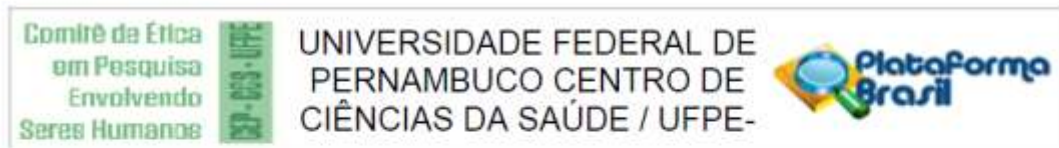
Os benefícios relacionados ao estudo constam em saber se o paciente com LESJ ou AIJ possui um tipo de alteração no gene HLA-G que predispõe o desenvolvimento da doença. A descoberta de que tipo de gene HLA-G está associado com o desenvolvimento do lúpus eritematoso sistêmico juvenil (LESJ) e da artrite idiopática juvenil (AIJ), poderá contribuir para um melhor esclarecimento dessas doenças. Após o término da pesquisa será fornecido informações ao paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um tema relevante e atual sobre duas patologias reumatológicas comuns na faixa etária pediátrica, para as quais ainda não se conhece detalhadamente o papel do produto

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

SANTOS, R. S. N.



Continuação do Parecer: 510.151

codificado pelo gene HLAG, portanto, a depender dos resultados obtidos será possível melhorar o nível de conhecimento sobre a gênese destas doenças, bem como, propiciar novas estratégias de acompanhamento terapêutico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram anexados à Plataforma Brasil. Cabe ressaltar que a autorização do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) está condicionada à aprovação do projeto pelo seu Comitê (CEP - IMIP), aprovação esta que não foi anexada à Plataforma Brasil.

No que diz respeito à solicitação de inclusão do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) como mais um local de pesquisa, o pesquisador apresentou como justificativa que a referida inclusão ajudaria a alcançar o número de participantes de pesquisa estabelecido quando da definição da amostra

Recomendações:

Encaminhar, por meio de notificação, a aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada, aguardando aprovação do Comitê de Ética do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados, devendo aguardar a aprovação do Comitê do IMIP.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

SANTOS, R. S. N.

ANEXO C – QUESTIONÁRIO COM VALORES DAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS PARA CÁLCULO DE SLEDAI

SLEDAI		
Valor	Manifestação	Definição
8	Convulsão	Aparecimento recente* Exclusão de causas metabólicas, infecciosas ou medicamentosas
8	Psicose	Alteração severa da atividade normal acompanhada de alteração de percepção de realidade. Compreende: alucinações, incoerência, pensamento ilógico, comportamento bizarro, desorganização ou catatonia. Exclusão de insuficiência renal ou causa medicamentosa.
8	Comportamento Cerebral	Alteração das funções mentais com distúrbios de orientação, da memória ou outra de aparecimento súbito. Exclusão de causas infecciosas, metabólicas ou medicamentosa.
8	Distúrbios visuais	Nódulos, hemorragia retiniana, exsudato seroso ou hemorragia coroidiana, neurite óptica. Exclusão de causas hipertensivas, medicamentosas ou infecciosas.
8	Nervos cranianos	Neuropatia sensitiva ou motora de aparecimento recente atingindo um nervo craniano
8	Cefaléia	Severa e persistente, podendo ser migranosa, resistente aos analgésicos comuns
8	AVC	Acidente vascular cerebral recente, excluída arterosclerose
8	Vasculite	Úlceras, gangrena, nódulos digitais dolorosos, infartos peri-ungueais
4	Artrite	Mais de duas articulações dolorosas com sinais dolorosos locais (dor, edema ou rigidez articular)
4	Miosite	Dor/fraqueza muscular proximal associada à uma elevação de CK ou aldolase ou à modificações eletromiográficas ou à uma biópsia mostrando sinais de miosite
4	Cilindros Urinários	Cilindros de globules vermelhos
4	Hematúria	> 5 hemácias/campo. Ausência de litíase, infecção ou outra causa
4	Proteinúria	>0,5 g/24h. Aparecimento recente ou piora recente de mais de 5 g/24h
4	Piúria	> 5 leucócitos/campo na ausência de infecção
2	Rash	Aparecimento recente ou recidiva de uma erupção cutânea inflamatória
2	Alopécia	Aparecimento recente ou recidiva de uma alopecia em placa ou difusa
2	Úlceras mucosas	Aparecimento recente ou recidiva de úlceras orais ou nasais
2	Pleurisia	Dor torácica de origem pleural com atrito, derrame ou espessamento pleural
2	Pericardite	Dor pericárdica com ao menos uma das manifestações seguintes: atrito, derrame ou confirmação eletrográfica ou ecográfica
2	Complemento	Diminuição de CH50, C3 ou C4
2	Anti-DNA	Positividade superior à taxa normal do laboratório
1	Febre	> 38°C na ausência de causa infecciosa
1	Leucopenia	< 3000 leucócitos na ausência de causa medicamentosa
1	Plaquetopenia	< 100.000/mm ³

* Aparecimento recente é considerado quando o quadro iniciou até 10 dias antes da consulta na qual está sendo feita a avaliação