



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TATIANA MAYUMI VEIGA IRIYODA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS BIOMARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO E A ATIVIDADE
DA DOENÇA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO**

TATIANA MAYUMI VEIGA IRIYODA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS BIOMARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO E A ATIVIDADE
DA DOENÇA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão.

Londrina
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Iriyoda, Tatiana Mayumi Veiga.

Associação entre os biomarcadores de estresse oxidativo e nitrosativo e a atividade de doença em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico / Tatiana Mayumi Veiga Iriyoda. - Londrina, 2015.
96 f. : il.

Orientador: Andréa Name Colado Simão.

Coorientador: Isaías Dichi.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Lúpus eritematoso sistêmico - Teses. 2. Estresse oxidativo - Teses. 3. Óxido nítrico - Teses. 4. Oxidação de DNA e RNA - Teses. I. Simão, Andréa Name Colado . II. Dichi, Isaías. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

TATIANA MAYUMI VEIGA IRIYODA

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS BIOMARCADORES DE ESTRESSE
OXIDATIVO E NITROSATIVO E A ATIVIDADE DA DOENÇA EM
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Name
Colado Simão
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Isaías Dichi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 14 de dezembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelas portas que me foram abertas, por sua proteção e graça, pela força e esperança a cada desafio.

À orientadora, Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão, pela oportunidade de participar do grupo de pesquisa, pela paciência, por tudo que me ensinou, pelo incentivo em cada trabalho, pelo apoio nos momentos mais difíceis, pelo exemplo de mãe, esposa, mestre e pesquisadora, tendo que administrar tantas tarefas e vidas ao mesmo tempo, com extrema dedicação e amor.

Ao Prof. Dr. Isaías Dichi, pela oportunidade de participar dos trabalhos e por fazer parte desta banca, pelo incentivo à produção científica, pela gentileza, pelas orientações e por nos ensinar a lapidar os textos com tanto esmero.

Ao prof. Dr Marcell Alysson Batisti Lozovoy, por fazer parte desta banca e, em especial, pela dedicação às pesquisas, pelas orientações, pela atenção e apoio durante as coletas de dados e a análise laboratorial.

Agradeço o trabalho de todo o grupo de pesquisa: professores doutores e funcionários do laboratório de Imunologia do Hospital Universitário (HU) / UEL, técnicos do setor de coletas e, em especial, à Dra. Neide Tomimura Costa, parceira na coleta de dados, pelo incentivo e orientações em cada etapa do programa e, às colegas da pós, Ana Paula Kallaur, Sayonara Oliveira, Francieli Delongui, Danieli F. Alfieri, Nicole P. Stadlober, Katerine Panichi Z. Ferreira e Tamires Flauzino, que se dedicaram na coleta de dados, na análise bioquímica e de estresse oxidativo.

Aos nossos pacientes e aos doadores de sangue que participaram como controles, pela disposição e colaboração nesse e em tantos outros projetos.

À família, em especial meu esposo, pelo incentivo à minha carreira profissional e acadêmica, pela compreensão nos momentos em que precisamos abrir mão de muitas coisas para nos dedicarmos mais ao estudo e ao trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina e aos dedicados professores doutores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental / UEL que possibilitam o crescimento pessoal e profissional de tantos alunos.

IRIYODA, Tatiana Mayumi Veiga. **Associação entre os biomarcadores de estresse oxidativo e nitrosativo e a atividade da doença em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico**. 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica autoimune, de etiologia multifatorial, caracterizada pela produção de autoanticorpos direcionados especialmente contra antígenos nucleares. A etiologia do LES ainda é desconhecida, sendo que fatores genéticos, hormonais, imunológicos e ambientais estão associados ao seu desenvolvimento. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, importantes ferramentas do sistema imune inato, podem favorecer o desenvolvimento do LES através da geração de neoantígenos, disfunção das células imunes, desregulação da apoptose e reatividade dos autoanticorpos. A oxidação de DNA é fundamental no desencadeamento de anticorpos contra DNA, um dos principais anticorpos envolvidos na fisiopatologia do LES. Apesar da importância da oxidação dos ácidos nucleicos na indução da produção de autoanticorpos, poucos estudos avaliaram este marcador em pacientes com LES e sua associação com a atividade da doença. **Objetivo:** investigar a associação entre os biomarcadores de estresse oxidativo e nitrosativo (EO&N), em particular produtos de oxidação de DNA/RNA, com a presença de LES e a atividade da doença avaliada pelo escore SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*). **Métodos:** Foram selecionados 188 controles saudáveis, 153 pacientes com LES inativo (SLEDAI < 6) e 50 pacientes com LES ativo (SLEDAI ≥ 6). Todos os participantes foram avaliados clinicamente quanto a sexo, etnia, índice de massa corporal (IMC), uso de medicamentos, entre outros dados. Os testes imunológicos avaliados foram: pesquisa de anticorpos antinucleares (ANA) por imunofluorescência indireta utilizando células HEp-2, pesquisa de anticorpos anti-dsDNA por ELISA e, dosagem dos componentes do sistema complemento, C3 e C4, por turbidimetria. Quanto aos biomarcadores de EO&N, foram avaliados: determinação de hidroperóxidos lipídicos avaliados por quimioluminescência iniciada por terc-butil hidroperóxido, produtos avançados de oxidação protéica (AOPP) por espectrofotometria, produtos de lesão oxidativa de DNA e RNA por ensaio imunoenzimático (ELISA), metabólitos de óxido nítrico (NOx) avaliados pelo método de Griess e, finalmente, a capacidade antioxidante total no plasma pela metodologia de TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*). Os dados categóricos foram analisados pelo teste exato de Fisher ou Qui-quadrado, quando apropriado e os dados expressos em número absoluto. As comparações entre o grupo controle e os pacientes com LES, entre grupo LES sem doença ativa e com doença ativa e de acordo com a positividade de anticorpos anti-dsDNA foram realizadas usando o teste de Mann-Whitney e os dados foram expressos como mediana (25% -75%). Para determinar quais variáveis foram independentemente associadas com LES e com a atividade de doença avaliada pelo SLEDAI, as variáveis que apresentaram $p < 0.10$ na análise univariada foram incluídas no modelo de regressão logística multivariada. A regressão linear foi aplicada entre o escore SLEDAI e NOx e entre o escore SLEDAI e produtos oxidados de DNA/RNA. Os resultados foram considerados como significativos quando $p < 0.05$. Foi utilizado o programa de análise estatística SPSS 20.0 (SPSS,

Chicago, IL, USA). **Resultados:** Pacientes com LES apresentaram aumento dos níveis plasmáticos de hidroperóxidos ($p < 0.0001$), AOPP ($p < 0.0001$) e redução do TRAP ($p < 0.0001$) e de Nox ($p = 0.017$) quando comparados ao grupo controle. Os níveis plasmáticos de produtos de oxidação de DNA/RNA ($p = 0.481$) não diferiram entre esses grupos. Os níveis de hidroperóxidos (OR:1.000, IC95%:1.000-1.000, $p = 0.004$) e AOPP (OR: 1.004, IC95%:1.000-1.007, $p = 0.030$) foram diretamente, e de TRAP (OR:0.983, IC95%:0.981-0.987, $p < 0.0001$), inversamente associados à presença de LES, independentemente da etnia, idade e IMC. Pacientes com LES em atividade apresentaram redução nos níveis de Nox ($p < 0.0001$) e de produtos de oxidação de DNA/RNA ($p = 0.003$) quando comparados àqueles com doença não ativa. Os níveis plasmáticos de hidroperóxidos ($p = 0.165$), AOPP ($p = 0.123$) e o TRAP ($p = 0.869$) não diferiram entre esses grupos. Os produtos de oxidação de DNA/RNA (OR:1.000, IC 95%:0.999-1.000, $p = 0.021$) e Nox (OR:0.943, IC 95%:0.913-0.974, $p < 0.0001$) foram inversamente associados à atividade da doença, independentemente do sexo, IMC e da dose de prednisona. A análise de regressão linear demonstrou que cerca de 5% do escore SLEDAI pode ser explicado pelos níveis de produtos de oxidação de DNA/RNA ($R^2:0.051$, $p = 0.002$) e cerca de 9% deste escore pelos níveis de NOx ($R^2:0.091$, $p < 0.0001$). **Conclusão:** O perfil de biomarcadores de EO&N é diferente para o diagnóstico e monitoramento da atividade da doença. Enquanto hidroperóxidos, AOPP e TRAP estão associados à presença de LES, NOx e produtos de oxidação de DNA/RNA estão associados à sua atividade.

Palavras-chave: Lúpus Eritematoso Sistêmico. Estresse Oxidativo. Óxido Nítrico. Oxidação de DNA. Oxidação de RNA. Escore SLEDAI.

IRIYODA, Tatiana Mayumi Veiga. **Association between biomarkers of oxidative and nitrosative stress and disease activity in patients with Systemic Lupus Erythematosus**. 2015. 96 p. Dissertation (Master's Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a chronic inflammatory autoimmune disease, with multifactorial etiology, characterized by the production of autoantibodies directed especially against nuclear antigens. The etiology of SLE is unknown and multifactorial, with genetic, hormonal, immunological and environmental factors associated with its development. The reactive oxygen and nitrogen species, as important arms of the innate immune system, can favor the development of SLE, by generating neoantigens, dysfunction of immune cells, apoptosis deregulation and reactivity of autoantibodies. The DNA oxidation is crucial for triggering antibodies against DNA, one of the most important antibodies involved in the pathophysiology of SLE. Despite the importance of nucleic acids oxidation in inducing autoantibody production, few studies have evaluated this marker in patients with SLE and its association with disease activity. **Objective:** To study the association of the biomarkers of oxidative and nitrosative stress (O&NS), in particular oxidation products of DNA/RNA, with SLE presence and disease activity assessed by the SLEDAI score (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index). **Methods:** We selected 188 healthy controls, 153 patients with inactive SLE (SLEDAI <6) and 50 patients with active SLE (SLEDAI ≥ 6). All participants were assessed clinically in relation to gender, ethnicity, body mass index (BMI), use of medications among other data. Immunological tests included: antinuclear antibodies (ANA), quantified using indirect immunofluorescence with HEp-2 cells as substrate, antibodies against double-stranded DNA (anti-dsDNA) by enzyme linked immunoassay (ELISA) and, serum complement factors C3 and C4 levels, measured by immunoturbidimetric assay. The following biomarkers of O&NS were evaluated: determination of lipid hydroperoxides through quimioluminescencia initiated by tert-butyl hydroperoxide, advanced products of protein oxidation (AOPP) by spectrophotometry, oxidation products of DNA and RNA by ELISA, nitric oxide metabolites (NOx) evaluated by Griess method, and finally, the total antioxidant capacity in plasma by the methodology of TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter). Categorical data were analyzed by Fisher's exact test or chi-square test when appropriate. The results were demonstrated through absolute number. Comparison between control group and SLE patients, SLE group with active and inactive disease, and positive and negative anti-dsDNA were made using Mann-Whitney test, with data expressed as median (25%-75%). The results of these univariate statistical analyses were used to delineate the significant explanatory variables to be used, as determinants of independent association with diagnostic groups, in a subsequent logistic regression analyses. Bivariate logistic regression analysis was used to define the significant association of SLE versus controls, and active versus inactive disease using the biomarkers with $p < 0.10$. Linear Regression was applied between SLEDAI and NOx or DNA/RNA oxidative damage. All tests were 2-tailed and a p-value of 0.05 was used for statistical significance. All analyses were conducted with SPSS 20.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA). **Results:** Patients with SLE showed increased

plasma levels of lipid hydroperoxides ($p < 0.0001$) and AOPP ($p < 0.0001$) and reduction of TRAP ($p < 0.0001$) and NOx ($p = 0.017$) compared to the control group. Plasma levels of oxidation products of DNA/RNA ($p = 0.481$) did not differ between the groups. The levels of lipid hydroperoxide (OR:1.000, 95%CI:1.000-1.000, $p = 0.004$) and AOPP (OR:1.004, 95%CI:1.000-1.007, $p = 0.030$) were directly, whereas TRAP (OR:0.983, 95%CI:0.981-0.987, $p < 0.0001$) was inversely associated with the presence of SLE, regardless of ethnicity, age and BMI. Patients with active SLE had reduced levels of NOx ($p < 0.0001$) and DNA/RNA oxidation products ($p = 0.003$) compared to those with no active disease. Plasma levels of lipid hydroperoxides ($p = 0.165$), AOPP ($p = 0.123$) and TRAP ($p = 0.869$) did not differ between these groups. The DNA/RNA oxidation products (OR:1.000, 95%CI:0.999-1.000, $p = 0.021$) and NOx (OR:0.943, 95%CI:0.913-0.974, $p < 0.0001$) were inversely associated with disease activity, regardless of gender, BMI and prednisone dose. The linear regression analysis showed that about 5% of the SLEDAI score can be explained by the levels of DNA/RNA oxidation products ($R^2:0.051$; $p = 0.002$) and about 9% of this score by the levels of NOx ($R^2:0.091$; $p < 0.0001$). **Conclusion:** The biomarkers profile of O&NS is different for the diagnosis and monitoring of disease activity. While hydroperoxide, AOPP and TRAP are associated with the presence of SLE, NOx and DNA/RNA oxidation products are associated with disease activity.

Keywords: Systemic lupus erythematosus. Oxidative stress. Nitric oxide. DNA oxidation. RNA oxidation. SLEDAI score.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Envolvimento da apoptose e do prejuízo do clearance celular na fisiopatologia do Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	16
Figura 2 – Mecanismos patogênicos dos anticorpos anti-dsDNA.....	18
Figura 3 – Envolvimento do estresse oxidativo na patogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios de classificação do Lúpus Eritematoso Sistêmico do Colégio Americano de Reumatologia (CAR) de 1997	30
Tabela 2 – Critérios de classificação do Lúpus Eritematoso Sistêmico do <i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics</i> (SLICC) de 2012	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Anticorpo anti-nuclear
AU	Ácido úrico
anti-DNA	Anticorpo anti-ácido desoxiribonucléico
anti-dsDNA	Anticorpo anti-ácido desoxiribonucléico dupla fita
anti-Smith	Anticorpo anti-Smith
anti-SSA	Anticorpo anti-Ro
anti-SSB	Anticorpo anti-La
anti-U1-RNP	Anticorpo anti-U1-ribonucleoproteína
AOPP	Produtos Avançados da Oxidação Protéica
BAFF	<i>B cell activating factor</i>
BCR	Receptor de célula B
CAR	Colégio Americano de Reumatologia
CL-LOOH	Lipoperoxidação por quimiluminescência
CO	contraceptivo oral
CR1	Receptor do complemento 1
C1r/s	Complemento 1 fração r/s
C1q	Complemento 1 fração q
C2, C3, C4	Complementos 2, 3 e 4
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DHEA	Dehidroepiandrosterona
EBV	Epstein-Barr vírus
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EO	Estresse oxidativo
EO&N	Estresse oxidativo e nitrosativo
EROs	Espécies reativas do oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
FAN	Fator antinuclear
FcyR	Receptores da porção Fc da Imunoglobulina
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida

GSSG	Glutathiona oxidada
HLA	Antígeno leucocitário humano
HNE	Hidroxinonenal
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Radical peróxido de hidrogênio
HO ₂ ·	Radical hidropoxila
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN	Interferon
IFN I	Interferon tipo 1
IFN-α	Interferon tipo alfa
IMC	Índice de massa corpórea
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IgG	Imunoglobulina G
IL-6, IL-10, IL-12	Interleucinas 6, 10 e 12
IL-1β	Interleucina 1 beta
IRF5, IRF7	Fator Regulador de Interferon 5 e 7
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MDA	Malondialdeído
NETs	Redes extracelulares por neutrófilos
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
NOx	Metabólitos do óxido nítrico
NO ⁻	Ânion nitroxil
O ₂	Oxigênio Molecular
¹ O ₂	Oxigênio singlet
·OH	Radical hidroxila
O ₂ ⁻ ·	Radical superóxido
ONOO·	Peroxinitrito
8-OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina

QL	Quimioluminescência
RNA	Ácido ribonucléico
ROO ⁻	Radical peroxila
SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
SLICC	<i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics</i>
SOD	Superóxido dismutase
Th1	<i>T helper 1</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
Th17	<i>T helper 17</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAP	<i>Total radical-trapping antioxidant parameter</i>
TRH	Terapia de reposição hormonal
Treg	Célula T regulatória

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Etiologia e Fisiopatologia do Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	13
1.2	Estresse Oxidativo e Nitrosativo no Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	22
1.3	Diagnóstico Clínico e Laboratorial do Lúpus Eritematoso Sistêmico	28
1.4	Avaliação de Atividade da doença.....	32
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral.....	34
3.2	Objetivos Específicos	34
4	METODOLOGIA	35
4.1	Delineamento e População do Estudo.....	35
4.1.1	CrITÉRIOS de inclusão	35
4.1.2	CrITÉRIOS de exclusão	35
4.2	Determinações.....	36
4.3	Análises Bioquímicas e Imunológicas.....	36
4.4	Avaliação do Estresse Oxidativo	36
4.4.1	Quimioluminescência (QL) induzida por t-Butil Hidroperóxidos	36
4.4.2	Determinações de produtos avançados de oxidação protéica.....	37
4.4.3	Capacidade antioxidante total plasmática.....	37
4.4.4	Metabólitos do óxido nítrico	38
4.4.5	Oxidação de DNA/RNA.....	38
4.5	Análise Estatística	39
5	RESULTADOS	40
5.1	Artigo Científico	41
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
	REFERÊNCIAS	67

APÊNDICES	81
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (pacientes).....	82
APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (controles).....	84
APÊNDICE C – Ficha de avaliação dos pacientes	86
APÊNDICE D – Ficha de avaliação dos controles	87
ANEXOS	88
ANEXO A – Escore SLEDAI	89
ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da Universidade Estadual de Londrina	90
ANEXO C – Instruções para autores da revista Scandinavian Journal of Rheumatology.....	93

1 INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica autoimune caracterizada pela produção de autoanticorpos direcionados contra antígenos nucleares e suas proteínas de ligação (OATES, 2010). Uma resposta imune inata inapropriada e sustentada está envolvida no dano tecidual, através da liberação de citocinas inflamatórias, assim como na ativação de células T e B autoreativas, com conseqüente produção de autoanticorpos patogênicos (CRAFT, 2011; SHLOMCHIK; CRAFT; MAMULA, 2001). O LES é uma doença autoimune heterogênea que pode afetar qualquer órgão ou sistema, de forma leve ou severa, com um amplo espectro de manifestações clínicas e sorológicas. O curso da doença é marcado por períodos de remissão e de atividade (GILES; BOACKLE, 2013).

A prevalência estimada de LES na população é de 20-70 casos por 100.000 habitantes e a incidência é de 1 a 10 por 100.000 habitantes/ano (PONS-ESTEL et al., 2010). A incidência e prevalência são maiores entre descendentes de africanos e asiáticos do que populações brancas. Acomete mais a faixa etária de 16 a 55 anos, sendo 9 vezes mais frequente em mulheres (CHAKRAVARTY et al., 2007; JOHNSON et al., 1995; McCARTY et al., 1995). No Brasil, os dados sobre prevalência e incidência são escassos, com uma incidência de LES em torno de 4,8 a 8,7 casos para cada 100.000 pessoas por ano, de acordo com estudos epidemiológicos realizados na região Nordeste e Sul do país (NAKASHIMA et al., 2011; VILAR; SATO, 2002).

Os pacientes apresentam atualmente taxas de sobrevida em 5 anos de 90% e em 15-20 anos em torno de 80% (ABU-SHAKRA; GLADMAN; UROWITZ, 2004; BJORNADAL et al., 2004; MOSS et al., 2002). A doença tende a ser mais grave em homens e crianças (CARRENO et al., 1999; WANG et al., 2003). O LES de início tardio, após os 50 anos, tende a um início insidioso, menor envolvimento dos órgãos e sistemas e menor grau de atividade de doença (FORMIGA, 1999; PU, 2000). Independentemente da idade e do sexo, hispânicos, afro-americanos e asiáticos apresentam maior comprometimento hematológico, neurológico e renal, além de maior chance de dano acumulado ao longo da evolução do que pacientes brancos (ALARCÓN et al., 2002; COOPER et al., 2002; PONS-ESTEL et al., 2004; SAMANTA et al., 1991). Aspectos

culturais e socioeconômicos também têm impacto sobre a atividade da doença, progressão de danos e qualidade de vida (ALARCÓN et al, 2006).

A maior taxa de mortalidade dos pacientes com LES em relação à da população em geral está associada com a atividade inflamatória da doença, às infecções graves decorrentes da imunossupressão e, tardiamente, às complicações da própria doença e do tratamento. A doença cardiovascular constitui um dos principais fatores de morbidade e mortalidade desses pacientes (CERVERA et al., 2003; FEI et al., 2014; SOUZA; SANTO; SATO, 2012).

1.1 Etiologia e Patogenia do Lúpus Eritematoso Sistêmico

A etiologia do LES ainda é desconhecida, sendo que fatores genéticos, hormonais, imunológicos e ambientais estão associados ao seu desenvolvimento (LISNEVSKAIA; MURPHY; ISENBERG, 2014). A concordância de LES em gêmeos idênticos, o aumento da frequência de LES entre parentes de primeiro grau e o aumento do risco de desenvolvimento da doença entre irmãos reflete uma herança poligênica da doença. A concordância da doença em gêmeos idênticos é de 25-50% e entre gêmeos dizigóticos em torno 5% (PZETISKY, 1997).

Diferentes genes contribuem para a susceptibilidade à doença e envolvem polimorfismos do antígeno leucocitário humano (HLA) classe II, em especial os HLADR2 e DR3 (PZETISKY, 1997), além de deficiências herdadas do complemento, particularmente para os componentes C1q, C1r/s, C2 e C4 (TRUEDSSON; BENGTTSSON; STURFELT, 2007). Polimorfismos em genes não-HLA também têm sido associados com LES e incluem genes que codificam a proteína ligadora de manose, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o receptor de célula T, a interleucina 6 (IL-6), o receptor de complemento 1 (CR1), imunoglobulinas, receptores de cadeia gama da porção Fc da imunoglobulina G (Fc γ RIIA and Fc γ RIIIA) e a proteína do choque térmico 70 (SCHUR, 1995; SULLIVAN, 2000).

Diversos estudos observacionais sugerem a participação dos hormônios sexuais na expressão da doença, pela maior prevalência em mulheres e um pico de

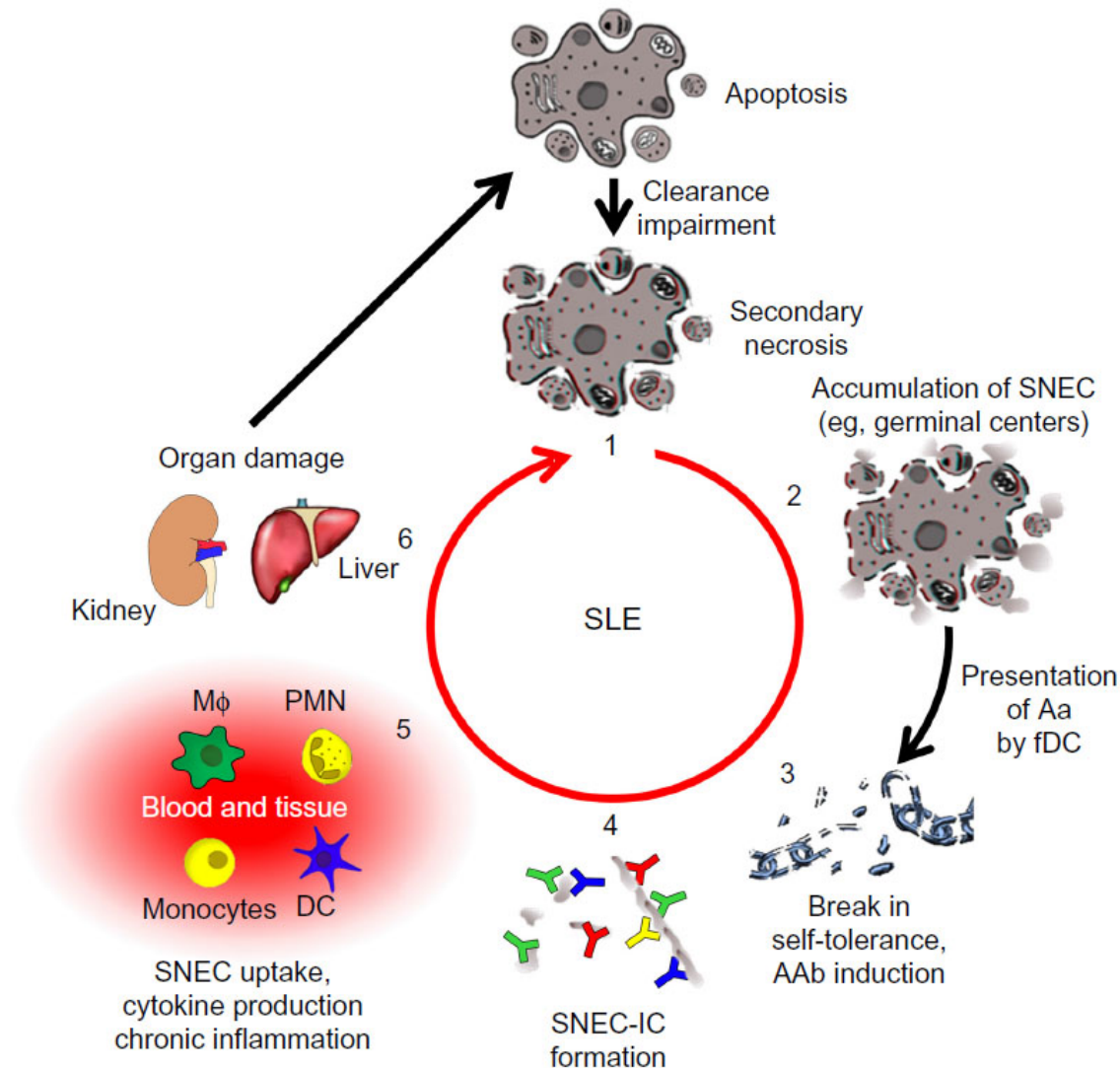
incidência entre a menarca e a menopausa (PETRI, 2002; SIMARD; COSTENBADER, 2007). Estudos têm relacionado o uso de contraceptivo oral (CO) e terapia de reposição hormonal (TRH) ao aumento do risco de LES (BERNIER et al., 2009; COSTENBADER et al., 2007), sendo esse risco associado ao estrogênio. Em relação à possibilidade do CO e da TRH de induzirem recaída e atividade da doença, os estudos demonstraram que o uso de baixas doses de estrógeno e o uso de progestágeno, isoladamente ou em combinação, não aumentaram o risco de aumento da atividade da doença em mulheres com doença estável ao longo de 12 meses de seguimento (PETRI et al., 2005; SANCHEZ-GUERRERO et al., 2005). Em outro estudo com mulheres mais idosas e com atividade leve da doença, a TRH com estrógeno e progesterona resultou em apenas discreto aumento na taxa de recaída ao longo de 12 meses (BUYON et al., 2005). O uso de progestágeno isolado, tanto como CO quanto em TRH em mulheres com LES não aumentou a atividade da doença. (CHABBERT-BUFFET et al., 2011; SANCHEZ-GUERRERO et al., 2005; VIEIRA et al., 2008). Os dados em relação aos efeitos da gravidez no LES ainda são conflitantes (OSTENSEN; VILLIGER; FORGER, 2012; ZEN et al., 2010), porém no conjunto os estudos indicam que os hormônios na gestação são fracos determinantes do risco de atividade da doença. O preditor mais importante de atividade do LES na gestação é a presença de doença ativa nos 6 meses anteriores à concepção (BARBHAIYA; BERMAS, 2013).

A excessiva atividade estrogênica e inadequada atividade androgênica em homens e mulheres com LES podem explicar algumas das alterações na resposta imune e as disparidades entre os sexos (MOK; LAU, 2003). No LES o estrógeno aumenta o risco da doença em mulheres geneticamente predispostas, através do aumento da produção de interferon (IFN) tipo 1, inibição da resposta celular T *helper* 1 (Th1) e aumento da produção de citocinas da resposta celular T *helper* 2 (Th2), promovendo o aumento da sobrevivência de linfócitos B autoreativos que produzem autoanticorpos patogênicos (HUGHES; CHOUBEY, 2014; KANDA; TSUCHIDA; TAMAKI, 1999). Níveis séricos baixos de androgênios foram encontrados em pacientes com LES (STRAUB et al., 2004; MOK; LAU, 2000). O hipogonadismo em homens está fortemente associado a um aumento na incidência de auto-imunidade, indicando um papel imunossupressor do androgênio (JACOBSON et al., 1997). Os androgênios exercem efeito inibitório na diferenciação das células Th1 e induzem produção de interleucina 10 (IL-10) (LIVA; VOSKUHL, 2001). Além

disso, a testosterona reduziu a produção de imunoglobulinas por células mononucleares do sangue periférico em indivíduos saudáveis e pacientes com LES (KANANDA; TSUCHIDA; TAMAKI, 1996, 1997). A evidência de que a deficiência em androgênios pode estar associada com o desenvolvimento do LES nos seres humanos (Straub et al., 2004) despertou o interesse no uso de androgênios como terapia no LES, especialmente o uso de dehidroepiandrosterona (DHEA) (VAN VOLLENHAVEN et al., 1998; NORDMARK et al., 2005). Chang et al. (2002) demonstraram que a DHEA na dose de 200mg/dia, durante 24 semanas reduziu a taxa de recaída em 16% no grupo LES (61 mulheres) em comparação com o grupo placebo (59 mulheres) avaliada pelo escore SLAM (*Systemic Lupus Activity Measure*) e escore SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*). Em outro estudo, Petri et al. (2004) também demonstraram que a DHEA melhorou e estabilizou a doença sem deterioração significativa pelo escore SLEDAI e possibilitou redução de corticosteróide em pacientes com LES.

A alteração imunológica central em pacientes com LES é a produção de autoanticorpos direcionados ao DNA, histonas e nucleossomos, além de outros componentes da cromatina. A cromatina, considerada o principal antígeno no LES, deriva provavelmente de células apoptóticas e/ou necróticas, inclusive de redes extracelulares por neutrófilos, conhecidas como *neutrophil extracellular traps* (NETs) (REKVIG; DER VLAG, 2014). A apoptose está envolvida na manutenção da homeostase dos tecidos e é caracterizada pela fragmentação da cromatina e formação de corpos apoptóticos (FRANSEN et al., 2009c). Autoantígenos e a cromatina podem ser modificados durante o processo de apoptose e assim dar início à quebra de tolerância. Além disso, há fortes evidências de defeitos no clearance de células apoptóticas e debris celulares no LES. (DIEKER; VAN DER VLAG; BERDEN, 2002, 2004; MUNOZ et al., 2008, 2010). Os restos apoptóticos circulantes servem como imunógenos para a indução de linfócitos autoreativos e como antígenos para a formação de imunocomplexos (FIGURA 1). A remoção de imunocomplexos por células fagocíticas também é defeituosa em pacientes com LES (SALMON et al., 1996), em parte pelo número reduzido de receptores do complemento e defeitos funcionais de receptores nas superfícies celulares (MIR et al., 1988; KISS et al., 1996).

Figura 1 – Envolvimento da apoptose e prejuízo do clearance celular na fisiopatologia do Lúpus Eritematoso Sistêmico.

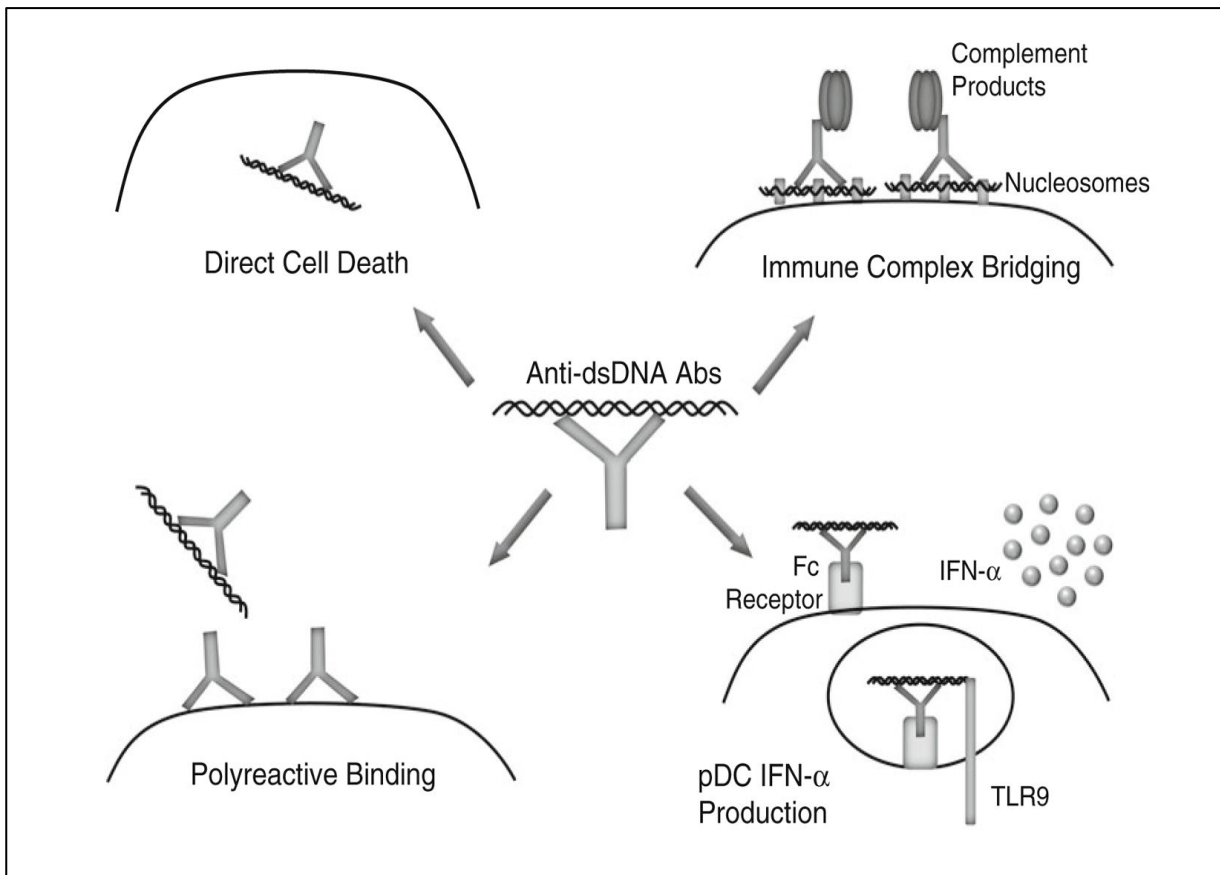


1-A deficiência no clearance de células apoptóticas leva à autoimunidade e inflamação crônica. 2- Quando as células em apoptose não conseguem ser recolhidas a tempo, elas entram em necrose secundária, levando ao acúmulo de SNEC. 3-A auto-tolerância é quebrada quando autoantígenos derivados de SNEC são apresentados para as células B auto-reativas pela fDC. Com a ajuda de células auxiliares T auto-reativas, estas células B sofrem maturação e diferenciam-se em células B de memória, estabelecendo-se assim a auto-imunidade. 4-IC são formados quando os auto-anticorpos (AAb) encontram as SNEC em circulação ou no tecido. 5-Os SNEC-IC formados são então processados pelos fagócitos e células dendríticas acompanhados pela secreção de citocinas pró-inflamatórias. 6-Isto por sua vez leva a graves danos nos órgãos e morte celular alimentando o ciclo vicioso que mantém a inflamação crônica. SNEC, material derivado de célula necrótica secundária; fDC, célula dendrítica folicular; IC, imunocomplexos; SLE, lúpus eritematoso sistêmico; DC, célula dendrítica; MΦ: macrófago, PMN: polimorfonuclear.

Fonte: adaptado de Podolska et al, 2015.

Os anticorpos contra DNA de dupla fita (anti-dsDNA), também chamado de DNA nativo, são os anticorpos anticromatina mais estudados no LES. Complexos imunes contendo DNA e anti-dsDNA se depositam nos tecidos, levam à ativação do complemento e consequente inflamação, particularmente nos rins (MORTENSEN; FENTON; REKVIG, 2008; MORTENSEN; REKVIG, 2009). Anticorpos anti-dsDNA patogênicos no LES são tipicamente anticorpos IgG de alta afinidade, diferentemente dos anticorpos naturais que usualmente são IgM de baixa afinidade (FORGER et al., 2004; WINKLER; JAHN; KALDEN, 1991). Antígenos próprios e não próprios podem induzir à produção de anti-dsDNA, tais como: complexos proteína-DNA de corpos apoptóticos e de oxidação (CASCIOLA-ROSEN; ANHALT; ROSEN, 1994), micropartículas liberadas de células não envolvidas no processo de morte celular (BEYER; PISETSKY, 2010), NETs liberadas em resposta a patógenos invasores (HAKKIM et al., 2010; JEONG et al., 2009), além de produtos microbianos e DNA viral, em especial do Epstein Barr-Virus (EBV) (FÜST, 2011; SHARMA; ISENBERG; DIAMOND, 2001). Os possíveis mecanismos patogênicos dos anticorpos anti-dsDNA (FIGURA 2) incluem: efeito citopático direto por meio de indução de apoptose após ligação com o DNA da célula; ligação a diferentes superfícies celulares por polireatividade a antígenos não-dsDNA; ligação ao componente DNA do nucleossomo gerando imunocomplexos na superfície celular e ativação do complemento e, por fim, indução da secreção de interferon alfa (IFN- α) após ativação de TLR9 (do inglês, *toll like receptor 9*) por complexos contendo DNA (GILES; BOACKLE, 2013).

Figura 2 - Mecanismos patogênicos dos anticorpos anti-dsDNA.



Os anticorpos anti-dsDNA podem atuar por uma variedade de mecanismos: entrar diretamente nas células e induzir apoptose através de ligação ao DNA (acima à esquerda); ligação a diferentes superfícies celulares por polireatividade a antígenos não-dsDNA (abaixo à esquerda); se ligar ao componente DNA dos nucleossomos que, eletrostaticamente fixam o imunocomplexo à superfície celular (acima à direita) e, induzir a secreção de IFN- α após internalização mediada por receptor de Fc e ativação de TLR9 por dsDNA (abaixo à direita).

Fonte: Adaptado de Giles; Boackle, 2013.

As células dendríticas também têm papel importante na autoimunidade no LES. As células dendríticas mielóides, ativadas pelas vesículas apoptóticas, por cromatina modificada e imunocomplexos contendo cromatina, aumentam a secreção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 beta (IL-1 β), a IL-6 e o TNF- α (BOULE et al., 2004; BOUTS et al., 2012; FRANSEN et al., 2009a; FRANSEN et al., 2009b). A IL-6 inibe o desenvolvimento das células T regulatórias (Tregs) e estimula o desenvolvimento das células T *helper* 17 (Th17) que ativam células B autoreativas (GARRETT-SINHA; JOHN; GAFFEN, 2008). Imunocomplexos e NETs podem ativar outro subtipo de células

dendríticas, as células dendríticas plasmocitóides, iniciando resposta de IFN tipo 1 com a produção de IFN- α (GARCIA-ROMO et al., 2011; KAPLAN, 2011; LANDE et al., 2011). O IFN- α apresenta diversas funções como: facilitação da maturação de células dendríticas mielóides, ativação de células B e T e estimulação da morte celular mediada por NETs, amplificando assim a resposta autoimune contra a cromatina (RONNBLOM; ALM; ELORANTA, 2009).

As células B apresentam papel importante na patogênese do LES, através da secreção de anticorpos patogênicos, apresentação de antígenos e secreção de citocinas (ANOLIK, 2007; MOK; LAU, 2003). Além disso, subpopulações de células B contribuem diferentemente para a atividade da doença e expressão de autoanticorpos. Após ativação antigênica, as células B podem se tornar plasmócitos de vida curta, plasmócitos de vida longa ou células de memória. Os plasmócitos de vida curta residem nos tecidos onde são gerados e vivem por semanas a meses, sendo incapazes de secretar anticorpos na presença de drogas antiproliferativas (GRAMMER; LIPSKY, 2003). Os plasmócitos de vida longa, residem na medula óssea e secretam anticorpos por muitos anos, mesmo na presença de drogas antiproliferativas. Seriam responsáveis pela secreção, por exemplo, do anticorpo Anti-RNP (ribonucleoproteína), que apresenta expressão ao longo de toda vida do paciente e não tem seus níveis afetados pela imunossupressão. Já plasmócitos de vida curta estariam associados com anticorpos anti-dsDNA, uma vez que seus títulos flutuam em associação com atividade da doença e diminuem com o tratamento imunossupressor (NASHI; WANG; DIAMOND, 2010).

O estímulo de receptores de células B (BCR) e de *Toll-like receptors* (TLRs), em particular TLR-7 e TLR9, que reconhecem RNA e DNA, leva à amplificação da sinalização na célula B. A interação desses receptores com vias de sinalização culmina com a ativação de fatores de transcrição NF- κ B (fator nuclear kappa B), IRF5 (fator regulador de interferon 5) e IRF7 (fator regulador de interferon 7) e, conseqüentemente, ao aumento de sobrevivência da célula B, à produção de autoanticorpos e de citocinas, dentre elas de IFN do tipo 1 (IFN-I) (MOHAN; PUTTERMAN, 2015; OBERMOSER; PASCUAL, 2010). Tanto o aumento (TSUBATA; HONJO, 2000), quanto a deleção/disfunção de moléculas de sinalização (KONO et al., 2005) via BCR têm seu papel no desenvolvimento de autoimunidade.

A molécula BAFF (do inglês, *B-cell activating factor*) tem assumido grande relevância por seu papel na fisiologia e autoreatividade das células B, sendo expressa na superfície celular ou secretada por monócitos, macrófagos, células dendríticas e células T ativadas. Ela é regulada por citocinas inflamatórias e agonistas de TLRs. A BAFF se liga a receptores expressos na célula B, com conseqüente ativação de sinais que promovem a sobrevivência das células B através da indução da ativação de uma via alternativa do NF- κ B (MACKAY; SILVEIRA; BRINK, 2007).

As células T tem papel crítico na fisiopatologia do LES, uma vez que regulam a resposta das células B e infiltram os tecidos, levando ao dano tecidual. Anormalidades de sinalização levam a defeitos de transcrição genética e produção alterada de citocinas, resultando em células T com fenótipo hiperexcitável no LES (MOULTON; TSOKOS, 2011). A ativação de células B e T leva à geração de células efetoras, que incluem plasmócitos e células T *helper* 17 (Th17), implicados na patogênese da nefrite lúpica (CHANG et al., 2011; NEUBERT et al., 2008; SHAH et al., 2010b). Modelos animais de LES e pacientes com LES exibem aumento dos níveis de IL-17 e aumento do número de células Th17 circulantes que se correlacionam com atividade da doença (AMARILYO et al., 2014). Alguns estudos têm demonstrado redução do número e da função de células T regulatórias em pacientes e animais com lúpus (KIM et al., 2011; WANG et al., 2005).

A mudança de resposta Th1 para Th2 gera um desequilíbrio de citocinas em pacientes com LES, com conseqüente resposta imune celular deficiente, sendo que a desregulação do equilíbrio de IL-10/IL-12 desempenha um papel crucial. A IL-10 é uma citocina Th2 que age como potente estimulador da proliferação e diferenciação das células B, e dessa forma, um potente mediador de ativação policlonal das células B no LES (MOK; LAU, 2003). Estudos recentes demonstraram maiores concentrações séricas de IL-10 em pacientes com LES do que nos controles e correlação com atividade de doença e títulos de anti-dsDNA (GRONDAL et al., 2000; HOUSSIAU et al., 1995; PARK et al., 1998). A IL-12, produzida por células B, macrófagos e células dendríticas exerce atividade inibidora da resposta humoral (TRINCHIERI, 1994). Tyrrell-Price, Lydyard e Isenberg (2001) demonstraram inibição da produção de anticorpos anti-dsDNA por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LES e doença ativa, quando em cultura celular com IL-12.

Muitos casos de LES são esporádicos, sem identificação de fatores genéticos predisponentes, sugerindo a participação de fatores ambientais ou exógenos como desencadeantes da doença. Agentes infecciosos podem induzir respostas específicas através de mimetismo molecular e distúrbios na regulação imune; a dieta afeta a produção de mediadores inflamatórios; agentes físicos e químicos, como a radiação ultravioleta podem causar inflamação, induzir apoptose celular e modificar a imunogenicidade a antígenos próprios (MOK; LAU, 2003).

O estresse oxidativo (EO) decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e o sistema de defesa antioxidante, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Os radicais livres são átomos e moléculas que contêm um ou mais elétrons não pareados em sua última camada (BARBOSA et al., 2010). A geração de radicais livres ocorre nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma, resultante do metabolismo do oxigênio e por isso são mais adequadamente denominados de espécies reativas do oxigênio (EROs).

Em condições fisiológicas do metabolismo aeróbico, o oxigênio (O_2) sofre redução tetravalente, resultando na formação de água (H_2O). Durante esse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peroxila (ROO^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlet (1O_2), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e o radical hidroxila ($\cdot OH$) (BIANCHI; ANTUNES, 1999). As EROS também podem interagir com o óxido nítrico (NO), produto de NO sintases, usualmente de processos inflamatórios, resultando na conversão de NO em diversas espécies reativas de nitrogênio (ERNs), que incluem o ânion nitroxil (NO^-) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) (SHAH et al., 2014). Os íons ferro e cobre são potentes catalizadores das reações de geração de EROs, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss.

As EROs, em baixas e moderadas concentrações, participam da regulação de processos celulares, incluindo sinalização celular, diferenciação, proliferação, crescimento, apoptose, regulação do citoesqueleto, além de papel importante para o sistema de defesa do organismo. O efeito deletério ocorre quando existe uma superprodução de EROs/ERNs e/ou deficiência do sistema antioxidante (SHAH et al.,

2014).

Para proteger-se dos danos causados pela ação deletéria das EROs/ERNs, existe um sistema de defesa antioxidante capaz de prevenir a formação de espécies reativas, impedir sua ação ou mesmo reparar uma lesão ocorrida. Esse sistema é dividido em enzimático e não-enzimático. O sistema enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase (GPx). Já o sistema não enzimático, inclui em especial as vitaminas C, E e A e os minerais zinco, cobre, selênio e magnésio (BARBOSA et al., 2010).

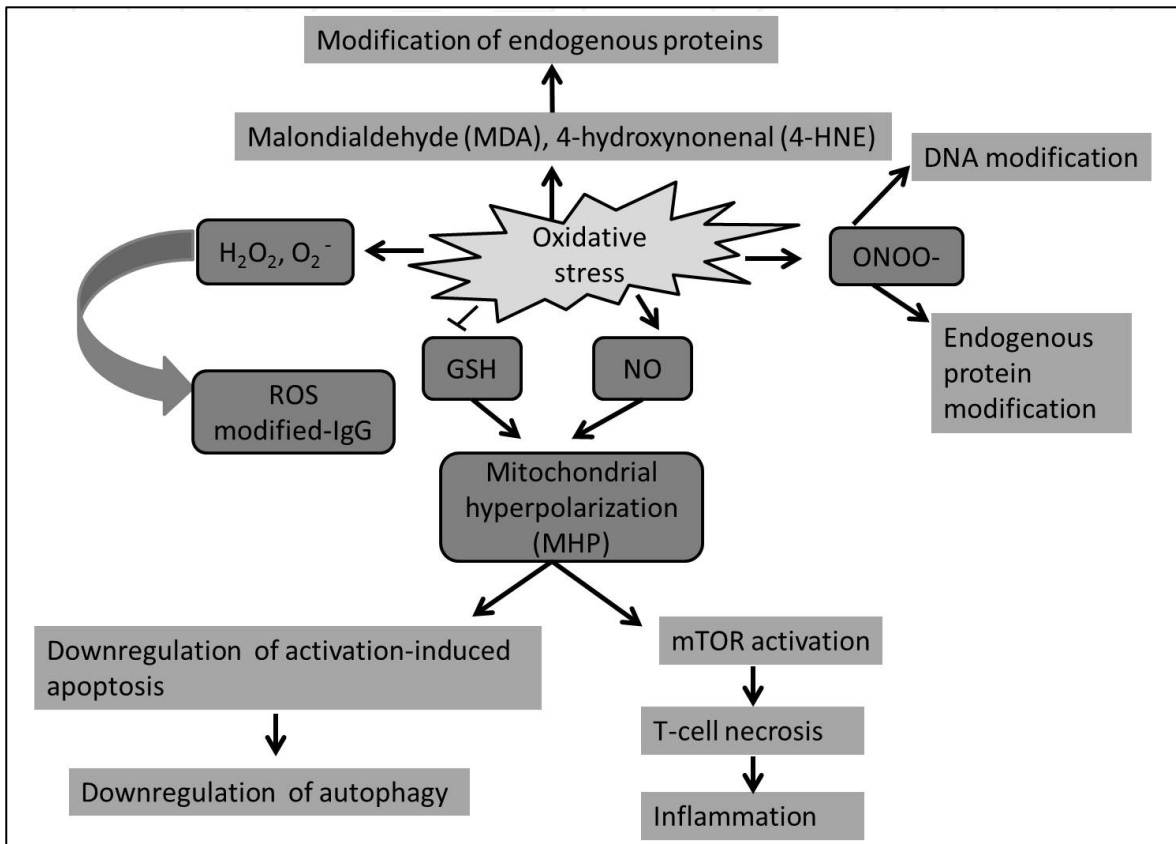
O dano oxidativo causado pelas EROs/ERNs tem contribuído para o desenvolvimento de diversas doenças crônicas, dentre elas a aterosclerose, o diabetes melitus, as doenças neurodegenerativas, o câncer e as doenças autoimunes (PEREZ et al., 2012).

1.2 Estresse oxidativo e nitrosativo (EO&N) no Lúpus Eritematoso Sistêmico

As EROs e ERNs, importantes ferramentas do sistema imune inato, podem favorecer o desenvolvimento do LES (FIGURA 3). As interações das ERO/ERNs com proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos estão envolvidas na geração de neoantígenos. Após processamento celular, esses neoantígenos geram respostas imunes que estimulam linfócitos T e B autoreativos (WANG et al., 2010) e a formação de autoanticorpos em pacientes com LES (AL-SHOBAILI et al., 2012; JOVANOVIC et al., 2013).

Diversos estudos têm demonstrado o papel das EROs na desregulação da apoptose (KURIEN; SCOFIELD, 2008; MUNOZ et al., 2008). O prejuízo na remoção de corpos apoptóticos pode prolongar a interação das EROs com debris nucleares e gerar neoepítomos que, em sequência, estimulam a formação de um amplo espectro de autoanticorpos, levando à inflamação e ao dano tecidual no LES (AHSAN; ALI A; ALI R, 2003).

Figura 3 - Envolvimento do estresse oxidativo na patogênese do Lúpus Eritematoso Sistêmico.



MDA, malondialdeído; 4-HNE, 4-hidroxinonenal; GSH, glutationa; MHP, hiperpolarização mitocondrial; NO, óxido nítrico; O_2^- , superóxido; $ONOO^-$, peroxinitrito.

Fonte: Adaptado de Shah et al., 2015.

Os produtos de modificação oxidativa de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos podem ser detectados em fluidos biológicos e se correlacionar com atividade de doença e danos aos tecidos em pacientes com LES, sugerindo sua atuação como biomarcadores (SHAH et al., 2014; LOZOVY et al., 2011).

Os efeitos deletérios das EROs são mais pronunciados nas membranas e organelas celulares, através da lipoperoxidação. A cascata de lipoperoxidação resulta em diferentes produtos finais de decomposição. Os três mais bem estudados marcadores de lipoperoxidação em pacientes com LES e modelos animais incluem o malondialdeído (MDA) e o hidroxinonenal (HNE), gerados por peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados e os isoprostanos, gerados por peroxidação do ácido araquidônico. O

MDA é extensivamente usado por conta de metodologia simples de detecção, como colorimetria, e níveis aumentados de MDA foram associados com nefrite lúpica e dano tecidual no LES (SHAH et al., 2010a; TURI et al., 1997). O HNE é um aldeído tóxico e exibe fácil reatividade com várias biomoléculas, inclusive proteínas e DNA. Níveis aumentados de HNE foram demonstrados em pacientes com LES e tiveram associação com início da doença (WANG et al., 2010, 2012). Os isoprostanos-F2 são um grupo de compostos bioativos semelhantes às prostaglandinas, usualmente quantificados por ELISA, e seus níveis foram associados com aumento de atividade de doença, fadiga e envolvimento vascular em pacientes com LES (ABOU-RAYA; HALLOUS; FAYED, 2004; AVALOS et al., 2007; SEGAL et al., 2012;). Lozovoy et al. (2011, 2014) utilizando quimioluminescência (CL-LOOH), método considerado mais sensível e menos propenso a artefatos (SIMÃO et al., 2008; CECCHINI; ARUOMA; HALLIWELL, 1990), demonstraram aumento de lipoperoxidação em pacientes com LES comparado com controles saudáveis, mas não houve diferença entre pacientes com LES ativo e não ativo. Foi demonstrado que pacientes com LES ativo apresentaram significativa correlação inversa entre doses diárias de prednisona e lipoperoxidação por CL-LOOH ($r = -0.484$, $p = 0.014$) (LOZOVY et al., 2011).

As EROs também podem modificar a estrutura e função das proteínas, através da adição de grupamentos carbonílicos, ligação cruzada ou sua fragmentação (MORGAN; STURGESS; DAVIES, 2009; SHAH; SAH; NATH, 2013). As proteínas carbonílicas e nitrotirosinas são os marcadores de oxidação protéica mais estáveis e amplamente utilizados nos diversos estudos. As proteínas carbonílicas são formadas por oxidação de resíduos de aminoácidos como a lisina, arginina, prolina e histidina. Circulam por longos períodos no sangue, sendo detectadas por reações colorimétricas. Estudos demonstraram aumento dos níveis de proteínas carbonílicas em pacientes com LES e variável correlação com atividade de doença (MORGAN; STURGESS; DAVIES, 2009; MORGAN et al., 2007). A nitrotirosina é gerada pela ação de ERNs, como peroxinitrito (ONOO^-) e dióxido de nitrogênio (NO_2) sob os resíduos de tirosina da proteínas. Níveis aumentados de 3-nitrotirosina foram associados com artrite, envolvimento cardíaco e renal em pacientes com LES (AHSAN, 2013; ZHANG et al., 2010). Lozovoy et al (2011) verificou um aumento na oxidação de proteínas por produtos avançados de oxidação

protéica (AOPP) em pacientes com LES comparado com controles ($p=0,007$), sem correlação com parâmetros de atividade da doença. A AOPP, resulta da oxidação de resíduos de aminoácidos, tais como a tirosina, levando à formação de produtos protéicos de ligação cruzada contendo ditirosinas, detectado por espectrofotometria (WITKO - SARSAT et al., 1998).

O DNA nativo não é imunogênico. Sendo assim, possíveis candidatos a antígenos patogênicos da doença incluem, polinucleotídeos, DNA desnaturado e DNA ou RNA modificado (AHSAN; ALI A; ALI R, 2003). Isso foi evidenciado por estudos em que anticorpos monoclonais anti-DNA reagiram mais fortemente com DNA desnaturado do que DNA nativo (AHMAD; ASHOK; ALI, 1998; DIAMOND et al., 1992; WU et al., 1990) e outro estudo que demonstrou anticorpos anti-DNA no LES com maior capacidade de ligação ao DNA modificado por ERO, além de reação cruzada ao DNA nativo (BLOUNT; GRIFFITHS; LUNEC, 1989).

As EROs podem causar danos oxidativos ao DNA e RNA contribuindo para a patogênese do LES, por influenciar a produção ou reatividade dos autoanticorpos, aumentar a antigenicidade e induzir a disfunção celular (ARA; ALI, 1994; BLOUNT et al., 1990; COOKE et al., 1997). A modificação do DNA/RNA por EROs as tornam macromoléculas mais susceptíveis à interação com autoanticorpos circulantes, promovendo a formação de imunocomplexos (EVANS et al., 2000; MAESHIMA et al., 2002; LUNEC et al., 1994). Defeitos no reparo do DNA oxidado também têm sido detectados no LES (BASHIR et al., 1993; McCURDY et al., 1997; LUNEC et al., 1994).

Apesar da importância da oxidação dos ácidos nucléicos na indução de autoanticorpos, poucos estudos têm avaliado esses marcadores em pacientes com LES e sua associação com atividade de doença. O marcador de DNA oxidado mais utilizado nos estudos já realizados é a 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG). (DALLE-DONNE et al., 2003; EVANS et al., 2000; ZAREMBA; OLINSKI, 2010). Lee et al. (2014) associou o aumento dos níveis séricos de 8-OHdG em pacientes com LES com sintomas mais graves e maior SLEDAI. Por outro lado, Lunec et al. (1994) mostrou que não houve aumento na excreção urinária de 8-OHdG com a atividade inflamatória do LES, por acúmulo de DNA alterado nos complexos imunes circulantes.

O óxido nítrico (NO) é um radical livre formado pela ação de NO sintases, usando arginina e oxigênio como substratos. O NO é produzido nas células endoteliais pela expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e é responsável pela vasodilatação e manutenção da função endotelial. A produção de NO também pode ser estimulada pelo aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), induzida em circunstâncias estimulatórias, como estresse oxidativo e citocinas pró-inflamatórias (LEVESQUE; WEINBERG, 2004).

O potencial do NO em induzir lesão depende da extensão da sua produção e da geração de superóxido (O_2^-), com posterior formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), potente agente oxidante e nitrativo que media a modificação de proteínas endógenas e DNA, aumentando sua imunogenicidade (criando neoepítomos com maior afinidade de ligação que os antígenos naturais) e levando à quebra de imunotolerância (DIXIT; ALI, 2004; HABIB MOINUDDIN; KHAN; ALI, 2006).

Diversos estudos têm demonstrado correlação significativa entre a produção sistêmica de NO e atividade do LES (AHSAN, 2013; HO et al., 2003; MAESHIMA et al., 2002; OATES; GILKESON, 2006; WANCHU et al., 1998). O aumento da expressão de iNOS tem sido reportado em glomérulos de pacientes com nefrite lúpica proliferativa (FURUSU et al., 1998; OATES et al., 1999; WANG et al., 1997) e na pele de pacientes com LES em associação com atividade de doença (BELMONT et al., 1997; KUHN et al., 1998). A análise da concentração de metabólitos do óxido nítrico (NOx) em pacientes com LES têm mostrado resultados contraditórios. Embora alguns estudos tenham demonstrado aumento dos níveis séricos de NOx em pacientes com LES e sua associação com atividade de doença (GILKESON et al., 1999; OATES et al., 2008), outros estudos não encontraram essa associação (GONZALEZ-CRESPO et al., 1998; HO et al., 2003; LOZOVY et al., 2011). OATES et al. (2008) observaram maiores níveis séricos de NOx em pacientes com nefrite lúpica proliferativa quando comparados àqueles com doença renal não-proliferativa ou com LES sem nefrite. No estudo de Gonzalez-Crespo et al. (1998) houve correlação entre os níveis séricos de NOx com o uso de prednisona > 20mg/dia e imunossupressores. Por outro lado, no estudo de Ho et al. (2003), as concentrações séricas de NOx não se correlacionaram com a dose de prednisolona, hidroxicloroquina, azatioprina e ciclosporina.

Nosso grupo demonstrou em muitas doenças crônicas (OLIVEIRA et al., 2012; LOZOVY et al., 2014; SIMÃO et al., 2011) que, embora haja um aumento da produção de NO induzida pelo desequilíbrio redox, simultaneamente pode ocorrer aumento do consumo de NO pelo estresse oxidativo, resultando em diminuição da sua biodisponibilidade (LI et al., 2007; LIN et al., 2007; TAO et al., 2007).

Os mecanismos de defesa antioxidante são constituídos por enzimas (SOD, catalase, enzimas relacionadas com a glutatona), vitaminas (A, C, E), minerais (cobre, ferritina, manganês, selenio, etc) e outros componentes não enzimáticos (flavonóides, carotenóides, glutatona) (HALLIWELL, 1991; LOZOVY et al., 2013). As defesas antioxidantes têm sido avaliadas em pacientes com LES por diferentes metodologias, com resultados conflitantes. A SOD é uma metaloproteína que cataliza a dismutação do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Foi relatada redução da atividade da SOD e formação de anticorpos contra SOD em pacientes com LES (SHAH et al., 2010a, 2011; TURGAY et al., 2007). A catalase, localizada nos peroxissomos e no citosol, decompõe o H_2O_2 em H_2O e O_2 , tendo sido observados níveis elevados de anticorpos contra catalase em pacientes com LES (BEN MANSOUR et al., 2010; MANSOUR et al., 2008). A glutatona, em tecidos saudáveis, encontra-se em 90% na sua forma reduzida (GSH) e em 10% na sua forma oxidada (GSSG). Mudanças nessa razão se correlacionam com atividade da doença em pacientes com LES (SHAH et al., 2013a; SHAH et al., 2013b). Poucos estudos avaliaram a capacidade antioxidante total (CAT) em pacientes com LES. Nuttall et al (2003) encontrou reduzida CAT por QL em pacientes com LES sem comorbidades comparado com controles, porém sem correlação com atividade da doença avaliada pelo índice BILAG (*British Isles Lupus Assessment Group*). Outros dois autores também encontraram níveis reduzidos de CAT avaliada por TRAP (*total radical-trapping antioxidant parameter*) por QL (Lozovoy et al., 2013) e por colorimetria (Lalwani et al., 2015), sem correlação com atividade de doença pelo SLEDAI. Muitas drogas mostram atividade antioxidante e podem interferir na determinação do estado antioxidante. Houve correlação positiva entre o uso de imunossupressores (Nuttall et al., 2003) e corticosteróide (Lozovoy et al., 2013) com a CAT, por diferentes metodologias.

1.3 Diagnóstico Clínico e Laboratorial do Lúpus Eritematoso Sistêmico

O diagnóstico de LES é baseado na experiência clínica, considerando diversos sinais e sintomas, associado a achados sorológicos, após exclusão de diagnósticos alternativos. Particular atenção é dada aos seguintes sinais e sintomas constitucionais: febre, fadiga, linfadenopatia, perda de peso, fotossensibilidade, rash malar, úlceras orais dolorosas, alopecia, fenômeno de Raynaud, dor articular ou artrite, dispnéia ou dor pleurítica, sintomas neurológicos e perdas gestacionais recorrentes (WALLACE, 2015).

O LES é caracterizado pela produção de uma série de autoanticorpos contra uma diversidade de antígenos celulares (YANIV, 2015). Sendo assim, a pesquisa laboratorial de autoanticorpos é fundamental no auxílio ao diagnóstico de LES. A pesquisa de anticorpos antinucleares (ANA), antigamente denominada de fator antinúcleo (FAN) é realizada por imunofluorescência indireta (IFI) utilizando como substrato as células HEp-2, uma linhagem de células tumorais derivadas de carcinoma de laringe humana. O ensaio apresenta alta sensibilidade e baixa especificidade (DELLAVANCE, 2007), sendo assim diante de um resultado positivo do teste FAN-HEp-2 deve-se considerar associação com doença autoimune, manifestação mínima ou achado precoce de doença auto-imune, infecção, uso de medicamentos, câncer (ARBUCKLE et al., 2003; MASSABKI et al., 1997; TAN et al., 1997) e até mesmo podendo não estar associado a doença sistêmica. A identificação apropriada dos padrões de IFI no FAN-HEp-2 e sua titulação fornece uma razoável indicação da possível especificidade dos auto-anticorpos detectados (DELLAVANCE, 2007). O padrão nuclear pontilhado grosso é virtualmente específico de anticorpos anti-Sm (anti-Smith) e/ou anti-U1-RNP (anti-U1-ribonucleoproteína), fortemente associados ao LES (MIGLIORINI, 2005; ROKEACHI; HOCH, 1992). Da mesma forma, o padrão nuclear homogêneo tende a ser ocasionado por anticorpos anti-dsDNA e antinucleossomo, considerados marcadores de LES (GONZALES et al., 2004).

O anti-dsDNA tem alta especificidade para o diagnóstico de LES, sendo encontrado em 70% dos pacientes (KAVANAUGH; SOLOMON, 2002). Os títulos de anti-dsDNA flutuam com a atividade da doença, sendo portanto considerado um marcador de atividade de doença (TER BORG et al., 1990). Anticorpos anti-dsDNA da classe IgG estão associados à glomerulonefrite por deposição de imunocomplexos e à disfunção renal no LES (FORGER et al., 2004; LINNIK et al., 2005). A pesquisa de anti-dsDNA pode ser

realizada por IFI utilizando como substrato hemoflagelado *Crithidia luciliae* ou por enzima-imunoenensaio (ELISA) (RIBOLDI et al., 2005).

Recentemente, considerável interesse tem sido dado ao papel do anticorpo antinucleossomo como ferramenta diagnóstica e de prognóstico no LES. A pesquisa desse anticorpo é realizada por ELISA, com igual especificidade porém maior sensibilidade para o diagnóstico de LES do que os anticorpos anti-dsDNA (BIZZARO et al., 2012). Os anticorpos antinucleossomos apresentam associação significativa com atividade da doença e comprometimento renal (MANSON et al., 2009; SULEIMAN et al., 2009).

Na ausência de um critério diagnóstico para o LES, os critérios de classificação de LES são frequentemente utilizados para auxiliar no diagnóstico. Em 1997, o Colégio Americano de Reumatologia (CAR) propôs um conjunto de parâmetros clínicos e laboratoriais para auxiliar no diagnóstico de LES (Tabela 1). Em 2012, o *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) propôs revisão dos critérios de classificação de 1997 do CAR (PETRI et al., 2012; HOCHBERG, 1997). O critério SLICC 2012 (Tabela 2) apresenta maior sensibilidade, porém menor especificidade que o critério CAR 1997 (sensibilidade de 97 versus 83% e especificidade de 84 versus 96%, respectivamente).

Tabela 1 - Critérios de classificação do LES do Colégio Americano de Reumatologia (CAR) de 1997.

1. Eritema malar
2. Lesão cutânea crônica (discóide)
3. Fotossensibilidade
4. Úlcera oral ou nasofaríngea
5. Artrite não erosiva, acometendo 2 ou mais articulações
6. Serosite: pleurite (dor/derrame/atrito) ou pericardite (dor/derrame/atrito/alteração no eletrocardiograma)
7. Acometimento renal: proteinúria persistente >0,5g/24h OU >3+ no exame de urina OU cilindros celulares
8. Convulsão ou psicose
9. Alterações hematológicas: anemia hemolítica com reticulocitose OU leucopenia < 4.000/mm ³ OU linfopenia < 1.500/mm ³ (em duas ou mais ocasiões) OU trombocitopenia < 100.000/mm ³ (em duas ou mais ocasiões)
10. Alterações imunológicas: anti-DNA positivo OU presença de anti-Sm positivo OU anticorpo antifosfolípide positivo (anticoagulante lúpico positivo e/ou anticardiolipina positivo (IgM/IgG) e/ou VDRL falso positivo por pelo menos 6 meses.
11. Presença de anticorpos antinucleares: título elevado de ANA pela IFI ou teste equivalente, em qualquer época da investigação

Requer 4 ou mais de 11 critérios durante evolução ou simultaneamente

CAR: Colégio Americano de Reumatologia; LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico; Ig: imunoglobulina; VDRL: sigla de Venereal Disease Research Laboratory para detecção de sífilis ANA: Anticorpo anti-nuclear; IFI: imunofluorescência indireta.

Fonte: Adaptado de Hochberg, 1997.

Tabela 2 - Critérios de classificação do LES do *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) de 2012.

Manifestação Clínica

1. Lúpus cutâneo agudo, incluindo: eritema malar (não discoide), lúpus bolhoso, necrólise epidérmica tóxica, eritema maculopapular, eritema fotossensível do lúpus ou lúpus cutâneo subagudo (psoriasiforme/anular)
2. Lúpus cutâneo crônico: lúpus discóide, lúpus hipertrófico/verrucoso, lupus profundus (paniculite), lúpus tímido, lúpus mucoso, sobreposição líquen plano/lúpus discóide
3. Úlcera mucosa: palato, cavidade oral, língua ou úlcera nasal
4. Alopecia não cicatricial
5. Artrite/Artralgia: sinovite (edema/derrame articular) ≥ 2 articulações ou artralgia (dor) ≥ 2 articulações com rigidez matinal ≥ 30 minutos
6. Serosite: pleurite (dor ≥ 1 dia/derrame pleural/atrito pleural) ou pericardite (dor ≥ 1 dia/derrame/atrito/alteração no eletrocardiograma)
7. Nefrite: proteinúria 24h > 500 mg ou relação proteína/creatinina > 500 mcg/mg (mg/g), cilindro eritrocitário
8. Neurológica: convulsão, psicose, mononeurite múltipla, mielite, neuropatia periférica/craniana, estado confusional agudo
9. Anemia hemolítica
10. Leucopenia ($< 4.000/\text{mm}^3$) ou linfopenia ($< 1.000/\text{mm}^3$), em pelo menos uma ocasião
11. Plaquetopenia ($< 100.000/\text{mm}^3$, em pelo menos uma ocasião)

Alteração Imunológica

1. ANA Hep2 positivo
2. Anti-dsDNA positivo
3. Anti-Sm positivo
4. Anticorpo antifosfolípide positivo: anticoagulante lúpico positivo, anticardiolipina positivo (título moderado/alto - IgA/IgM/IgG), VDRL falso positivo, anti- $\alpha 2$ glicoproteína 1 positivo
5. Complemento baixo: C3, C4, CH50
6. Coombs direto positivo (na ausência de anemia hemolítica)

Requer 4 de 17 critérios, incluindo pelo menos 1 de 11 critérios clínicos e 1 de seis critérios imunológicos

OU que o paciente tenha biópsia compatível com nefrite por LES na presença de ANA ou anti-dsDNA.

SLICC: Systemic Lupus International Collaborating Clinics; LES: Lúpus Eritematoso Sistêmico; ANA: Anticorpo anti-nuclear; Ig: Imunoglobulina; VDRL: sigla de Venereal Disease Research Laboratory para detecção de sífilis.

Fonte: Adaptado de Petri et al., 2012.

1.4 Avaliação de atividade da doença

Na prática clínica a atividade e gravidade da doença podem ser avaliados por uma combinação de história clínica, exame físico, avaliação dos diversos órgãos e exames sorológicos (ILLEI et al., 2004; JOLLY, 2010; LIU et al., 2013). A atividade de doença, no presente estudo foi avaliada segundo o escore SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*), que inclui 24 critérios clínicos e laboratoriais específicos, levando-se em conta os últimos 10 dias (BOMBARDIER et al., 1992). A pontuação pode variar de 0 a 105 pontos, onde 0 é obtido em casos de ausência de atividade e 105 nos casos com alta atividade da doença (anexo A). Não há um valor de corte pré-determinado para classificação de atividade da doença, no entanto tem sido considerada doença em atividade um escore SLEDAI ≥ 6 (BOMBARDIER et al., 1992). O SLEDAI apresentou bons resultados quanto à validade e reprodutibilidade também no Brasil (SATO et al., 1991). No ano de 2000, o SLEDAI foi revisado, dando origem ao SLEDAI-2K (GLADMAN; IBAÑEZ; UROWITZ, 2002) que leva em consideração a atividade persistente de alguns parâmetros e não a pontuação desses parâmetros apenas nos casos de início ou recorrência (FREIRE; SOUTO; CICONELLI, 2011).

Os títulos elevados de anticorpos anti-dsDNA, assim como a redução dos níveis dos complementos C3 e C4, consumidos pelos imunocomplexos formados, são indicativos de atividade da doença, particularmente em pacientes com glomerulonefrite ativa. Citopenias são observados na doença ativa (GRIFFITHS; MOSCA; GORDON, 2005). Elevação de creatinina e alterações no sedimento urinário refletem comprometimento renal e gravidade da doença (CORAPI; DOOLEY; PENDERGRAFT, 2015).

2 JUSTIFICATIVA

- Tem sido demonstrado que o EO&N está envolvido no desenvolvimento e na progressão do LES, sendo responsável pela indução da formação de um dos principais autoanticorpos presentes na doença, o anti-dsDNA.
- Os dados à respeito do envolvimento do EO&N na atividade da doença ainda são controversos.
- Os dados sobre oxidação de ácidos nucléicos são ainda bastante escassos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o estado redox em pacientes com LES e sua associação com atividade de doença.

3.2 Objetivos Específicos

- Comparar os biomarcadores de EO&N em pacientes com LES e indivíduos saudáveis (controles) e de acordo com a presença ou não de doença ativa;
- Verificar associações entre os biomarcadores de EO&N com o diagnóstico de LES e com da atividade de doença;
- Avaliar se há associação entre o escore SLEDAI e os marcadores de EO&N.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento e População do estudo

Estudo observacional tipo caso-controle envolvendo 203 pacientes com diagnóstico de LES selecionados consecutivamente e acompanhados no ambulatório de Reumatologia do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) de Londrina, entre março de 2013 e maio de 2015. O grupo controle foi composto por 188 indivíduos saudáveis doadores de sangue, atendidos pelo Hemocentro Regional de Londrina. Pacientes com LES foram divididos em dois grupos: pacientes com doença ativa (n=50) e doença inativa (n=153). O escore SLEDAI ≥ 6 foi utilizado como parâmetro para classificar em doença ativa (BOMBARDIER et al., 1992).

Todos os indivíduos assinaram termo de consentimento livre e esclarecido antes da realização de qualquer procedimento (apêndice A). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, sob parecer CAAE 01865212.000005231 (anexo B).

4.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos os pacientes portadores de LES que preencheram os critérios do CAR de 1997, e doadores de sangue atendidos pelo Hemocentro Regional de Londrina, de ambos os sexos e com idade entre 18 à 69 anos.

4.1.2 Critérios de exclusão

No grupo controle, os critérios de exclusão foram a presença de doença autoimune, cardíaca, renal ou hepática, uso de medicamentos anti-inflamatórios ou de suplemento nutricional com atividade antioxidante. No grupo de pacientes foram excluídos aqueles com outras comorbidades associadas, como por exemplo, diabetes, doenças infecciosas crônicas ou agudas, outras doenças autoimunes, doença hepática ou renal, uso de hipoglicemiantes e hipolipemiantes ou de suplemento nutricional com atividade

antioxidante.

Informações referentes ao estilo de vida, duração da doença, tabagismo (sim ou não), envolvimento dos órgãos e sistemas, uso de corticosteróides, drogas imunossupressoras, antilipemiantes e antihipertensivos foram obtidas durante a consulta clínica destes pacientes.

4.2. Determinações Antropométricas

O peso corporal foi aferido utilizando balança eletrônica com escala de 0,1kg. Os indivíduos vestiam roupas leves, sem sapatos, pela manhã. A altura foi aferida por meio de estadiômetro com escala de 0,1 cm. Índice de massa corpórea (IMC) foi calculado segundo a fórmula: peso (kg) dividido pela altura (m) elevada ao quadrado.

4.3. Análises Imunológicas

Os níveis séricos de complementos C3 e C4 foram mensurados usando turbidimetria (C800, Architect Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Anticorpos antinucleares (ANA) foram determinados através de IFI com células HEp-2 (IFI-ANA-HEp2-IgG, Viro-Immun-Labor-Diagnostika, GmbH, Oberursel, Germany) e considerados positivos quando título $\geq 1:160$. Anticorpos anti-dsDNA foram determinados através de ELISA (anti-dsDNA, Orgentec Diagnostika, GmbH, Germany) e considerado teste positivo quando os resultados obtidos foram $\geq 20IU/mL$.

4.4. Avaliação do Estresse Oxidativo e Nitrosativo

Amostras de sangue periférico foram obtidas com EDTA como anticoagulante e antioxidante, para avaliação do estresse oxidativo. Todas as amostras foram centrifugadas a 3.000rpm durante 15 minutos e alíquotas de plasma foram estocadas no freezer a $-70^{\circ}C$ até a utilização.

4.4.1 Quimioluminescência (QL) induzida por t-Butil Hidroperóxidos

A avaliação da formação de lipoperóxidos por QL foi efetuada em uma adaptação da técnica descrita por Flecha, Llesuy e Boveris (1991), para analisar a integridade dos mecanismos de defesa antioxidante não-enzimáticos e os níveis de lipoperóxidos. Este teste baseia-se na premissa de que um aumento de QL está relacionado com um estresse oxidativo prévio sofrido pelo tecido, levando ao consumo das defesas antioxidantes de baixo peso molecular, tais como vitamina E, e formação de lipoperóxidos, resultando em aumento da emissão de fótons.

As análises foram realizadas em frascos plásticos para cintilação com capacidade para 20 mL e protegidos da luz. O meio de reação consiste de 1750 μ L de tampão fosfato 30 mM pH 7,4 e KCl 20 mM (v/v) acrescidos de 250 μ L de soro e mais 20 μ L de terc-butil (t-BuOOH) com concentração final de 3 mM em 2,0 mL de meio de reação. A QL será medida em um contador β marca Beckman® (EUA) modelo LS 6000, em um modo de contagem não coincidente, com uma faixa de resposta entre 300 a 620nm. Este experimento foi conduzido a uma temperatura de 30°C. Os resultados foram expressos em contagem por minuto (c.p.m.).

4.4.2 Determinações de Produtos Avançados da Oxidação Protéica (AOPP)

Os níveis plasmáticos de AOPP foram determinados de acordo com o método de Witko-Sarsat et al. (1998). A técnica é baseada na formação de produtos de oxidação de proteínas por ação de agentes oxidantes e posterior reação destes produtos de oxidação com o iodeto de potássio em meio ácido. Os AOPP foram quantificados no plasma. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro termostatizado de duplo feixe (Thermo Spectronic ® modelo Hélios- α , Waltham, MA, EUA). Os valores foram expressos em μ moles/L de equivalente de cloramina.

4.4.3 Metabólitos do Óxido Nítrico (NOx)

Níveis séricos de NO foram avaliados através da concentração de nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) de acordo com a reação de Griess, complementada pela redução de nitrato em nitrito com cádmio (PANIS et al., 2011). Os resultados são expressos em μ M.

4.4.4 Oxidação de DNA/RNA

Os produtos de oxidação de DNA/RNA foram determinados por ELISA (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) para detectar todas as três guaninas oxidadas: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine de DNA, 8-hydroxyguanosine de RNA, e 8-hydroxyguanine, tanto de DNA quanto RNA. A concentração de DNA/RNA oxidado foi expressa em pg/mL.

4.4.5 Capacidade Antioxidante Total Plasmática

A capacidade antioxidante total plasmática foi avaliada pelo método de TRAP (*total radical-trapping antioxidant parameter*) por QL, em uma adaptação da técnica descrita por Repetto et al. (1996). Esta metodologia detecta antioxidantes hidro e lipossolúveis presentes no plasma. Ao meio de reação (1,8 mL de tampão glicina 0,1 M, pH 8,6) são acrescentados 100µL de luminol em solução aquosa 200µM, 5µL de soro diluído 50% em tampão glicina e 100µL de solução aquosa de 2,2' azo-bis (2- amidinopropano) 200mM. É bem sabido que o 2,2' azo-bis gera radicais peroxil rapidamente, via interação com radicais centrados em carbono e oxigênio molecular, causando a oxidação de lipídeos e proteínas em biomoléculas (YOKOZAWA et al., 2000). Estes radicais livres reagem com o luminol (que atua como um amplificador de sinal), produzindo QL. Esta reação é inibida pela superóxido dismutase (SOD), catalase e análogos da vitamina E. A adição de plasma também diminui a QL em níveis basais por um período (tempo de indução ti) proporcional à concentração plasmática de antioxidantes (TRAP) até que os radicais do luminol sejam regenerados, restituindo-se os níveis iniciais de QL. O sistema foi calibrado com análogo de vitamina E (Trolox), 100µL na concentração de 20 µM em tampão glicina pH 8,6. Uma comparação do tempo de indução depois da adição de concentrações conhecidas de Trolox e plasma, permitirão obter valores de TRAP em equivalentes de Trolox segundo a equação:

$$\text{TRAP } (\mu\text{M Trolox}) = D \times t \text{ amostra} / t \text{ Trolox}$$

D é um fator de diluição da amostra no meio de reação, t amostra é o tempo de indução promovido pela adição da amostra de plasma e t Trolox é o tempo de indução promovido por 1µM de Trolox. Os resultados são expressos em µM de Trolox. Este experimento é

conduzido em um contador β marca Beckman® (EUA) modelo LS 6000, utilizando-se um modo de contagem não coincidente por 30 minutos, com uma faixa de resposta entre 300 a 620 nM.

A concentração de ácido úrico (AU) é responsável por 60% da capacidade antioxidante plasmática total. Assim, as concentrações de TRAP foram corrigidas e expressas em μM Trolox por miligrama de ácido úrico (μM Trolox /mg AU) (SIMÃO et al., 2008; VENTURINI et al., 2012).

4.5 Análise Estatística

Os dados categóricos foram analisados pelo teste exato de Fisher ou Qui-quadrado, quando apropriado e os dados expressos em número absoluto. As comparações entre o grupo controle e os pacientes com LES, grupo LES sem doença ativa e com doença ativa e de acordo com a positividade de anticorpos anti-dsDNA foram realizadas usando o teste de Mann-Whitney, e os dados foram expressos como mediana (25%-75%). Para determinar quais variáveis foram independentemente associadas com LES e com a atividade de doença avaliada pelo SLEDAI, as variáveis que apresentaram $p < 0.10$ na análise univariada foram incluídas no modelo de regressão logística multivariada. A regressão linear foi aplicada entre escore SLEDAI e NOx e entre escore SLEDAI e produtos oxidados de DNA/RNA. Os resultados foram considerados como significativos quando $p < 0.05$. Foi utilizado o programa de análise estatística SPSS 20.0 (SPSS, CHICAGO, IL, USA).

5 RESULTADO

Como resultado dessa dissertação, foi submetido para publicação no periódico *Scandinavian Journal of Rheumatology*, o artigo intitulado: **Reduction of nitric oxide and DNA/RNA oxidation products are associated with active disease in Systemic Lupus Erythematosus patients.**

5.1 ARTIGO

ARTICLE

Reduction of nitric oxide and DNA/RNA oxidation products are associated with active disease in Systemic Lupus Erythematosus patients

NO and DNA/RNA oxidation products in active SLE

Tatiana Mayumi Veiga Iriyoda¹, Nicole Perugini Stadtlober², Marcell Alysson Batisti Lozovoy³, Francieli Delongui⁴, Neide Tomimura Costa⁵, Edna Maria Vissoci Reiche³, Isaias Dichi⁶, Andréa Name Colado Simão³

1. Department of Rheumatology, Pontificia Universidade Católica (PUC), Londrina, Paraná, Brazil;
2. Post Graduate Program in Experimental Pathology, University of Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brazil;
3. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, University of Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brazil;
4. Post Graduate Program in Health Sciences, University of Londrina (UEL), Londrina, Parana, Brazil;
5. Department of Rheumatology, University of Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brazil
6. Department of Internal Medicine, University of Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brazil

Corresponding author: Andrea Name Colado Simão, PhD. Department of Clinical Pathology. Robert Koch Avenue n° 60 Bairro Cervejaria, University of Londrina. Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86038-440 Tel: (55) 43 3371 2321 E-mail: deianame@yahoo.com.br

Keywords: systemic lupus erythematosus; oxidative stress; nitric oxide; DNA oxidation; RNA oxidation; SLEDAI

ABSTRACT

Objective: To evaluate biomarkers of oxidative and nitrosative stress in systemic lupus erythematosus (SLE) patients, in particular products of DNA/RNA oxidative damage and their correlation with disease activity.

Methods: This study included 188 controls and 203 patients; 153 with inactive SLE (SLEDAI < 6) and 50 with active SLE (SLEDAI \geq 6) without renal impairment. Oxidative stress was assessed by tert-butyl hydroperoxide-initiated by chemiluminescence, advanced oxidation protein products (AOPP), total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP), nitric oxide metabolites (NOx) and DNA/RNA oxidation products.

Results: Patients with SLE showed increased oxidative stress, as demonstrated by the augmentation of lipid hydroperoxides ($p < 0.0001$) and AOPP ($p < 0.001$) and reduced total antioxidant capacity ($p < 0.0001$), regardless of ethnicity, age and body mass index (BMI). However, these biomarkers did not differ between patients with active disease and in remission. NOx levels and DNA/RNA oxidation products were inversely and independently associated with disease activity ($p < 0.0001$ and $p = 0.021$, respectively), regardless of BMI and prednisone use. The linear regression analysis showed that about 5% of the SLEDAI score can be explained by the levels of DNA/RNA oxidation products ($R^2: 0.051$; $p = 0.002$) and about 9% of this score by the levels of NOx ($R^2: 0.091$; $p < 0.0001$).

Conclusions: This study provides evidence for a strong inverse association between serum NOx levels and DNA/RNA oxidation products and SLE disease activity, suggesting that oxidative/nitrosative stress markers may be useful in evaluating SLE disease activity and progression of the disease.

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune syndrome characterized by autoantibodies production, especially against nuclear components [1]. It follows a relapsing-remitting disease course, and the risk of flares varies between patients. Although it is believed that the etiology of SLE is multifactorial, it has been suggested that the increased production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively), as an important arm of the innate immune response, may favor its development [2].

Increased oxidative damage and decreased antioxidant capacity in SLE patients have been reported by several research groups [3-7]. ROS can attack all cellular biomolecules, including deoxyribonucleic acid (DNA), ribonucleic acid (RNA), lipids and proteins. Post-translational oxidative modifications of self-antigen may lead to the generation or unmasking of epitopes, resulting in the triggering of an autoimmune response [8]. Furthermore, the role of ROS/RNS in the deregulation of apoptosis and the delay in clearance of apoptotic cells may generate neo-epitopes that subsequently stimulate broad spectrum of autoantibodies formation, leading to inflammation and organ damage in SLE [9, 10].

Several studies reported increased endogenous nitric oxide (NO) synthesis in SLE, with implication in T-lymphocyte dysfunction [11]. Oxidative stress and proinflammatory cytokines may stimulate NO production by an increase in inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression [12]. Nevertheless, analysis of the concentration of nitric oxide metabolites (NOx) in patients with SLE has shown contradictory results; some authors have not found any alteration [13, 14], whereas others reported increased production [15, 16]. Although this increased NO production induced by redox imbalance, our group has shown in many inflammatory chronic diseases that an increased consumption of NO by oxidative stress can occur, resulting in decreased NOx bioavailability [17-

19].

The DNA released from apoptotic or necrotic cells may undergo oxidative changes in its structure, thus favoring their recognition by the immune system and consequent formation of anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA) [20, 21]. Anti-dsDNA is specific to SLE and can be detected in patients at least 2 years before diagnosis of clinical disease [22]. In addition, anti-dsDNA shows a correlation between titers and disease activity [23-25]. Despite the importance of nucleic acids oxidation in the induction of autoantibodies production, few studies have evaluated this marker in patients with SLE and investigated its association with disease activity.

Therefore, the aim of this study was to evaluate biomarkers of oxidative and nitrosative stress in SLE patients, in particular products of DNA/RNA oxidative damage, and their correlation with disease activity.

Subjects and Methods

The study included 391 subjects; 188 healthy individuals (the control group) were selected among blood donors of the University Hospital and 203 patients with SLE were selected from the ambulatory of Rheumatology of the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil, to participate in the study. SLE was diagnosed using the American College of Rheumatology (ACR) 1997 revised criteria [26]. Patients with SLE were also divided in two groups: patients with active disease (n=50) or inactive disease (n=153). Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) score ≥ 6 was used to classify SLE as active [27].

Information on lifestyle factors and medical history were obtained at clinical evaluation. Disease duration, organ involvement and therapy were recorded for each patient. Prednisone was

the only kind of corticosteroids the patients were taking at the time of inclusion, thus prednisone-equivalent calculation was not required. They had been taking the same prednisone dose at least for the past 4 months. No patient with SLE presented proteinuria. None of the subjects was receiving a specific diet. The individuals of both groups did not drink alcohol regularly. None of the participants in the study presented heart, thyroid, renal, hepatic, gastrointestinal or oncological diseases, and none were receiving estrogen replacement therapy or antioxidant supplements. All patients gave written informed consent and the study protocol was fully approved by the Ethical Committee of the University of Londrina (Paraná, Brazil).

Anthropometric and Blood Pressure Measurements

Body weight was measured to the nearest 0,1 kg by using an electronic scale, with individuals wearing light clothing, but no shoes, in the morning; height was measured to the nearest 0,1 cm by using a stadiometer. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared.

Immunological Biomarkers

Serum complement factors C3 and C4 levels were measured using a immunoturbidimetric assay (C8000 Architect Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Antinuclear antibodies (ANA) were quantified using indirect immunofluorescence with HEp2 cells as substrate (IFI-ANA-HEp 2-IgG, Viro-Immun-Labor-Diagnostika, GmbH, Oberursel, Germany) and were considered significant when titers $\geq 1:160$. Antibodies against double-stranded DNA (anti-dsDNA) were quantified using enzyme linked immunoassay (ELISA, anti-dsDNA, Orgentec Diagnostika, GmbH, Germany) and were considered significant when titers ≥ 20 IU/mL.

Oxidative Stress Measurements

Peripheral blood samples were obtained with EDTA, as anticoagulant and antioxidant, for evaluating oxidative stress. All samples were centrifuged at 3,000 rpm for 15 minutes and plasma aliquots were stored at freezer -70°C until use.

Tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH)

Lipid hydroperoxides in plasma was evaluated by CL-LOOH as described previously by Flecha, Llesuy and Boveris [28]. This method is considered to be much more sensitive and specific than the TBARS measurement, the usual method to determine lipid oxidation. The results were expressed in counts per minute (cpm).

Determination of Advanced Oxidation Protein Products (AOPP)

AOPP was determined in the plasma samples using the semi-automated method described by Witko-Sarsat et al. [29]. AOPP results from oxidation of amino acid residues such as tyrosine, leading to the formation of dityrosine-containing protein cross-linking products detected by spectrophotometry. AOPP concentrations were expressed as micromoles per liter (umol/L) of chloramines-T equivalents.

DNA/RNA oxidation damage products (DNA/RNA oxi)

This ELISA (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) for the measurement of DNA/RNA oxidative damage detects all three oxidized guanine species; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine from DNA, 8-hydroxyguanosine from RNA, and 8-hydroxyguanine from either DNA or RNA. DNA/RNA oxidation damage concentrations were expressed as pg/mL.

Nitric Oxide Metabolites (NO_x)

Serum levels of NO_x were assessed by nitrite (NO₂⁻) and nitrate (NO₃⁻) concentration, according to the Griess reaction, supplemented by the reduction of nitrate to nitrite with cadmium [30]. The results are expressed in μM.

Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter (TRAP)

Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter (TRAP) was determined as reported previously by Repetto et al. [31]. Briefly, this method detects hydrosoluble and/or lyposoluble plasma antioxidants by measuring the chemiluminescence inhibition time induced by 2,2-azobis (2-amidinopropane). The system was calibrated with the vitamin E analog Trolox and TRAP values were expressed in equivalent of μM Trolox/uric acid (mg/dL).

Statistical analysis

Categorical data were analyzed by Fisher's exact test or chi-square test when appropriate. The results were demonstrated through absolute number. Comparison between control group and SLE patients, SLE group with active and inactive disease, and positive and negative anti-dsDNA were made using Mann-Whitney test, with data expressed as median (25%-75%). The results of these univariate statistical analyses were used to delineate the significant explanatory variables to be used, as determinants of independent association with diagnostic groups, in a subsequent logistic regression analyses. Bivariate logistic regression analysis was used to define the significant association of SLE versus controls, and active versus inactive disease using the biomarkers with $p < 0.10$. Linear Regression was applied between SLEDAI and NO_x or DNA/RNA oxidative damage. All tests were 2-tailed and a p-value of 0.05 was used for statistical significance. All analyses were conducted with SPSS 20.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

Clinical and laboratory characteristics of SLE patients are shown in Table 1. The study included 203 patients with SLE, with an average duration of disease of 9 years (4.0 -14.0 years), 71,4% presented with a positive ANA; 51% with a positive anti-dsDNA (≥ 20 IU/mL) and 25% with active disease (SLEDAI ≥ 6). In relation to the therapy, 97% of SLE patients were using corticosteroids (prednisone average of 7,5mg/day), 71% antimalarials and 41% other immunosuppressors.

There was no difference between SLE patients and controls regarding the gender ($p = 0.684$), however SLE patients had significantly more non Caucasian subjects than the control group ($p = 0.016$) as well as SLE patients showed higher age ($p = 0.006$) and BMI ($p < 0.0001$) than controls (table 2). After adjusting for ethnicity, age and BMI, SLE patients showed increased hydroperoxides ($p < 0.0001$) and AOPP ($p < 0.001$) levels. There was no significant change in serum oxidized DNA/RNA levels ($p = 0.481$). The serum levels of NOx ($p = 0.017$) and TRAP ($p < 0.0001$) were significantly reduced in SLE patients compared with the control group (table 2).

The results of the univariate statistical analyses, after adjustment, were used to delineate the significant explanatory variables to be used, as determinants of independent association with diagnostic groups, in subsequent logistic regression analyses. Table 3 shows the outcome of a logistic regression analysis with the SLE group as dependent variable and the normal control group as the reference group and the significant biomarkers shown as explanatory variables. We found that hydroperoxides ($p = 0.004$), AOPP ($p = 0.030$) and BMI ($p = 0.003$) were significantly and positively associated with SLE, whereas TRAP ($p < 0.0001$) was significantly and inversely associated with SLE. However, there was no difference in NOx levels in relation to the control group ($p = 0.595$). Age ($p = 0.936$) and ethnicity ($p = 0.204$) showed that these variables did not change

the associations between the biomarkers and SLE.

Table 4 shows demographic, clinical and oxidative stress biomarkers from SLE patients with inactive and active disease. There was no difference between the groups related to ethnicity ($p=0.198$) and age ($p=0.366$), however SLE patients with active disease presented higher frequency of women compared to those with inactive disease ($p=0.033$). There was a trend of patients with active disease to present a higher BMI ($p=0.066$) and to take higher doses of daily prednisone ($p=0.067$). As expected, SLE patients with active disease had higher SLEDAI score ($p<0.0001$), higher serum levels of anti-dsDNA ($p=0.018$), and decreased C3 ($p=0.006$) and C4 ($p=0.007$) levels. The p-value was adjusted for sex, BMI and prednisone dose, factors which may influence oxidative stress parameters. Patients with active disease showed reduced serum levels of oxidized DNA/RNA ($p=0.003$) and NO_x levels ($p<0.0001$) compared to those with inactive disease. There was no difference between the groups in relation to hydroperoxides ($p=0.165$), AOPP ($p=0.123$) and TRAP ($p=0.869$).

Table 5 shows the outcome of a logistic regression analysis with the active SLE group (SLEDAI \geq 6) as dependent variable and the inactive SLE group (SLEDAI $<$ 6) as the reference group and the significant biomarkers shown as explanatory variables. We found that serum levels of oxidized DNA/RNA ($p=0.021$) and NO_x ($p<0.0001$) were inversely associated with disease activity independently of the BMI and the prednisone dose.

Patients with SLE who showed positive anti-dsDNA had lower DNA/RNA oxidation products concentrations than those without anti-dsDNA (figure 1). Linear regression analysis demonstrated that the DNA/RNA oxidation products (figure 2) and NO_x levels (figure 3) account for 5% and 9% of the SLEDAI score, respectively.

Discussion

The main finding of this study was that the reduced levels of NO_x and DNA/RNA oxidation products were inversely associated with SLE activity, regardless of the corticosteroid use. In addition, the increase of lipid and protein oxidation products and the reduction of TRAP levels were associated with the presence of SLE.

Despite the evidence for a role of oxidative stress in SLE, some studies that have investigated the effects of oxidative and nitrosative stress and antioxidant status in patients with SLE have shown conflicting results. Lipid peroxidation products are potential biomarkers for oxidative stress status in SLE [32-35] and several different methods can be used. Lipid peroxidation through CL-LOOH is a much more sensitive method and less prone to artifacts than others, such as malondialdehyde assay, used in patients with SLE [36-38]. Several studies have also shown increased extent of protein oxidation, most often demonstrated by protein carbonyls and nitrotyrosine, in the serum of patients with SLE [6, 7, 39, 40]. AOPP results from the oxidation of amino acid residues such as tyrosine, leading to the formation of dityrosine-containing protein cross-linking products, which can be detected by spectrophotometry [29]. Meanwhile, the antioxidant status has been reported in most studies through measurement of the levels of superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione related enzymes, but few studies evaluated the total antioxidant capacity in patients with SLE. These studies have found reduced total antioxidant capacity in SLE patients through different methodologies and patient's disease activity. In addition, many drugs, especially immunosuppressive agents and corticosteroids, show antioxidant activity and could interfere in antioxidant status determination [6, 41, 42].

In this study, patients with SLE showed increased oxidative stress, as demonstrated by the increase in lipid hydroperoxides and AOPP and reduced total antioxidant capacity, and these

biomarkers were independently associated with the presence of SLE, regardless of gender, age and BMI. These data are consistent with previous studies from our group [6, 17] and with studies from other researchers that also demonstrated a redox imbalance in patients with SLE [1, 9, 43, 44].

Several studies found that oxidative damage to serum proteins and other molecules characterize human lupus flares [34, 45, 46]. However, in the present study, similarly to other study from our group [6], serum hydroperoxides, AOPP and TRAP levels did not differ between SLE patients with active disease and in remission. In that study, SLE patients with disease activity showed a significant and inverse correlation of daily prednisone doses with CL-LOOH or TRAP, which could explain the absence of significant difference in oxidative stress between active and inactive disease. Taken together, our data demonstrate that although hydroperoxides, AOPP and TRAP are associated with the diagnosis of SLE, they are not associated with disease activity, at least when patients are using immunosuppressant therapy.

It has been suggested that NO production via iNOS plays an important role in the pathogenesis of several systemic autoimmune disorders [11, 43]. In SLE, data are contradictory. Although some studies demonstrated higher serum NOx levels in SLE patients and association with SLEDAI score, anti-dsDNA, low complement and lupus nephritis activity [46, 47], others did not find correlation between NOx and disease activity [6, 13]. In this study, we found that NOx levels were inversely and independently associated with disease activity evaluated by SLEDAI score. It is feasible to suggest that in conditions of inflammation and increased oxidative stress, NO is consumed in a reaction with superoxide anion yielding the strong oxidant peroxynitrite, which in turn accelerates the lipid peroxidation reaction and decrease NO bioavailability [19, 48-50]. Therefore, although this study did not show significant changes in biomarkers of oxidative stress in patients with active disease, the reduction of NOx is a robust indication that this may be occurring.

In the present study, DNA/RNA oxidation products were inversely and independently associated with disease activity. The most commonly used marker of oxidatively modified DNA is 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), a product of oxidatively modified DNA base guanine [51-53]. Lee et al. [54] showed that increased plasma 8-OHdG levels correlated with more severe clinical symptoms and higher SLEDAI. On the other hand, Lunec et al. [55] had shown no elevation of 8-OHDG urine excretion with inflammatory activity, but an accumulation of the altered DNA base in circulating immune complexes, resulting in a urine output 1.000-fold lower than in normal controls. We are not aware of any study to date that evaluated DNA/RNA oxidative damage through the detection of all three oxidized guanine species in SLE patients. The reduction in DNA/RNA oxidation in the active SLE patients compared to inactive patients could be explained by increased binding of anti-DNA antibodies to modified DNA. Furthermore, ROS modification of DNA can render these macromolecules more susceptible to interacting with circulating autoantibodies, thus promoting immune complex formation [52, 56], and thus preventing detection of these molecules in serum.

Some limitations must be considered in the present study. First, the cross-sectional design does not allow for inference causality. Second, several studies have shown that sex, age, ethnicity and corticosteroid use influences oxidative stress and thus may be considered important confounding factors; however, these aforementioned factors were controlled in this study. Third, another possible factor, which could interfere with NOx analysis, would be the increase in BMI in active SLE patients. It was previously shown that serum NOx levels are inversely correlated with BMI and waist circumference [49, 57]. However, our data show that the reduction in NOx levels were associated with disease activity independently of BMI and prednisone dose.

In conclusion, the results of this study provides evidence for a strong inverse association

between serum NO_x levels and DNA/RNA oxidation products and SLE disease activity, suggesting that oxidative/nitrosative stress markers may be useful in evaluating SLE disease activity and thus, progression of the disease. In addition, our data showed the importance of measuring oxidative stress with several methodologies with different assumptions. The understanding of the complex redox mechanisms involved in the context of the disease will proportionate a more accurate view of the phenomena.

Acknowledgments

This research was supported by the National Council of Brazilian Research (CNPq) and Araucaria Foundation from Paraná, Brazil.

References

1. Shah D, Mahajan N, Sah S, Nath SK, Paudyal B. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci [Internet]. Journal of Biomedical Science* 2014;21(1):23.
2. Oates JC. The biology of reactive intermediates in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2010;43(1):56–63.
3. Al-Shobaili H, Al Robaee A, Alzolibani A, Rasheed Z. Antibodies against 4-hydroxy-2-nonenal modified epitopes recognized chromatin and its oxidized forms: Role of chromatin, oxidized forms of chromatin and 4-hydroxy-2-nonenal modified epitopes in the etiopathogenesis of SLE. *Dis Markers* 2012;33(1):19–34.
4. Garg DK, Moinuddin, Ali R. Hydroxyl radical modification of polyguanylic acid: role of modified guanine in circulating SLE anti-DNA autoantibodies. *Immunol Invest* 2003;32:187–199.
5. Kurien BT, Scofield RH. Lipid peroxidation in systemic lupus erythematosus. *Indian J Exp Biol* 2006;44:349–356.
6. Lozovoy MAB, Simão ANC, Panis C, Rotter MAC, Reiche EMV, Morimoto HK, et al. Oxidative stress is associated with liver damage, inflammatory status, and corticosteroid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2011;20:1250–1259
7. Morgan PE, Sturges AD, Davies MJ. Evidence for chronically elevated serum protein oxidation

in systemic lupus erythematosus patients. *Free Radic Res* 2009;43(2):117–27.

8. Ohmori H, Kanayama N. Immunogenicity of an inflammation associated product, tyrosine nitrated self-proteins, *Autoimmun Rev* 2005;4(4):224-229.

9. Kurien BT, Scofield RH. Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens. *Autoimmun Rev* 2008;7:567–573.

10. Shah D, Sah S, Wanchu A, Wu MX, Bhatnagar A. Altered redox state and apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Immunobiology* 2012;218:620–7.

11. Nagy G, Koncz A, Telarico T, Fernandez D, Érsek B, Buzás E, et al. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2010;12: 210.

12. Levesque MC, Weinberg JB. The dichotomous role of nitric oxide in the pathogenesis of accelerated atherosclerosis associated with systemic lupus erythematosus. *Curr Mol Med* 2004;4:777–786.

13. Gonzales-Crespo MR, Navarro JA, Arenas J, Martin-Mola E, Cruz JDL, Gomes-Reino JJ. Prospective study of serum and urinary nitrate levels in patients with lupus erythematosus systemic. *Br J Rheumatol* 1998;37:972–977.

14. Wigand R, Meyer J, Busse R, Hecker M. Increased serum NGhydroxy-L-arginine in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus as an index of an increased nitric oxide synthase activity. *Ann Rheum Dis* 1997;56:330–332.

15. Belmont HM, Levartovsky D, Goel A, Amin A, Giorno R, Rediske J, et al. Increased nitric oxide production accompanied by the up regulation of inducible nitric oxide synthase in vascular endothelium from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1810–1816.

16. Wanchu A, Khullar M, Sud K, Bambery P, Sud A. Serum and urine nitrite and citrulline levels among patients with systemic lupus erythematosus: a possible addition to activity parameters? *J Clin Rheum* 2001;7:10–16.

17. Lozovoy MAB, Simão ANC, Morimoto HK, Iryioda TMV, Panis C, Reiche EMV, et al. Hypertension is associated with serologically active disease in patients with systemic lupus erythematosus: role of increased Th1/Th2 ratio and oxidative stress. *Scand J Rheumatol* 2014;43:59–62.

18. Oliveira SR, Kallaur AP, Simão ANC, Morimoto HK, Lopes J, Panis C, et al. Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: Association with the expanded disability status scale. *Journal of the Neurological Sciences* 2012;321:49–53.

19. Simão ANC, Lozovoy MAB, Simão TNC, Venturini D, Barbosa DS, Dichi JB, et al. Immunological and biochemical parameters of patients with metabolic syndrome and the participation of oxidative and nitroactive stress. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2011;44:707-712.

20. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes, *J. Exp. Med* 1994;179(4):1317-1330.
21. Gaipf US, Voll RE, Sheriff A, Franz S, Kalden JR, Herrmann M. Impaired clearance of dying cells in systemic lupus erythematosus, *Autoimmun Rev* 2005;4(4):189-194.
22. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *New Engl J Med* 2003;349(16):1526-33.
23. Linnik MD, Hu JZ, Heilbrunn KR, Strand V, Hurley FL, Joh T. et al. Relationship between anti-double-stranded DNA antibodies and exacerbations of renal disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum* 2005;52(4):1129-37.
24. Ng KP, Manson JJ, Rahman A, Isenberg DA. Association of antinucleosome antibodies with disease flare in serologically active clinically quiescent patients with systemic lupus erythematosus. *Arthr Care Res* 2006;55(6):900-4.
25. ter Borg EJ, Horst G, Hummel EJ, Limburg PC, Kallenberg CG. Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study. *Arthritis Rheum* 1990;33:634.
26. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725.
27. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI: a disease activity index for lupus patients. The Committee on prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum* 1992;35:630-640.
28. Flecha BG, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Rad Biol Med* 1991;10:93-100.
29. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Khoa TN, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998;161:2524-2532.
30. Panis C, Mazzucco T, Costa CZF, Victorino VJ, Tatakijara VR, Yamauchi LM, et al. *Trypanosoma cruzi*: Effects of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. *Exp Parasitol* 2011;127:58-65.
31. Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 1996;255:107-17.
32. Frostegard J, Svenungsson E, Wu R, Gunnarsson I, Lundberg IE, Klareskog L, et al. Lipid peroxidation is enhanced in patients with systemic lupus erythematosus and is associated with arterial and renal disease manifestations. *Arthritis Rheum* 2005;52:192-200.

33. Mohan IK, Das UN. Oxidant stress, anti-oxidants and essential fatty acids in systemic lupus erythematosus. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997;56:193–198.
34. Shah D, Kiran R, Wanchu A, Bhatnagar A. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to Th1 cytokine and disease activity. *Immunol Lett* 2010;129:7–12.
35. Spengler MI, Svetaz MJ, Leroux MB, Bertoluzzo SM, Parente FM, Bosch P. Lipid peroxidation affects red blood cells membrane properties in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014;58(4):489-95.
36. Casado MF, Cecchini AL, Simão ANC, Oliveira RD, Cecchini R. Free radical-mediated pre-hemolytic injury in human red blood cells subjected to lead acetate as evaluated by chemiluminescence. *Food Chem Toxicol* 2007;45:945–952.
37. Cecchini R, Aruoma OI, Halliwell B. The action of hydrogen peroxide on the formation of thiobarbituric acid-reactive material from microsomes or from DNA damage by bleomycin or o-phe- nanthroline. Artifacts in the thiobarbituric acid test. *Free Rad Res Commun* 1990;10:245–258.
38. Simão ANC, Dichi JB, Barbosa DS, Cecchini R, Dichi I. Influence of uric acid and g- glutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *Nutrition* 2008; 24:675–681.
39. Morgan PE, Sturgess AD, Hennessy A, Davies MJ. Serum protein oxidation and apolipoprotein CIII levels in people with systemic lupus erythematosus with and without nephritis. *Free Radic Res* 2007;41:1301–1312.
40. Zhang Q, Ye DQ, Chen GP. Study on the relationship between protein oxidation and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2008;29:181–184.
41. Nuttall SL, Heaton S, Piper MK, Martin U, Gordon C. Cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus - Evidence of increased oxidative stress and dyslipidaemia. *Rheumatology* 2003;42(6):758–62.
42. Lalwani P, Souza GKBB, Lima DSN, Passos LFS, Boechat AL, Lima ES. Serum Thiols as a Biomarker of Disease Activity in Lupus Nephritis. *PLoS ONE* 2015;10(3):e0119947.
43. Ahsan H, Ali A, Ali R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. *Clinical and Experimental Immunology* 2003;131(3):398–404.
44. Oates JC, Gilkeson GS. The biology of nitric oxide and other reactive intermediates in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 2006;121:243–50.
45. Morgan PE, Sturgess AD, Davies MJ. Increased levels of serum protein oxidation and correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum* 2005;52:2069–2079.
46. Oates JC, Shaftamn SR, Self SE, Gilkeson GS. Association of serum nitrate and nitrite levels with longitudinal assessments of disease activity and damage in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:263–272.

47. Gilkeson G, Cannon C, Oates J, Reilly C, Goldman D, Petri M. Correlation of serum measures of nitric oxide production with lupus disease activity. *J Rheumatol* 1999;26:318–324.
48. Li R, Wang WQ, Zhang H, Yang X, Fan Q, Christopher TA, et al. Adiponectin improves endothelial function in hyperlipidemic rats by reducing oxidative/nitrative stress and differential regulation of eNOS/iNOS activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293(6):E1703-8.
49. Lin, LY, Lee WJ, Shen HN, Yang WS, Pai NH, Su TC, et al. Nitric oxide production is paradoxically decreased after weight reduction surgery in morbid obesity patients. *Atherosclerosis* 2007;190:436-442.
50. Tao L, Gao E, Jiao X, Yuan Y, Li S, Christopher TA, et al. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Circulation* 2007;115(11):1408-16.
51. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003;329:23–38.
52. Evans MD, Cooke MS, Akil M, Samanta A, Lunec J. Aberrant processing of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:894–898.
53. Zaremba T, Olinski R. Oxidative DNA damage—analysis and clinical significance. *Postepy Biochem* 2010;56:124–138.
54. Lee HT, Lin CS, Lee CS, Tsai CY, Wei YH. Increased 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in plasma and decreased mRNA expression of human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1, anti-oxidant enzymes, mitochondrial biogenesis-related proteins and glycolytic enzymes in leucocytes in patients with systemic lupus ery. *Clin Exp Immunol* 2014;176(1):66–77.
55. Lunec J, Herbert K, Blount S, Griffiths HR, Emery P. 8-Hydroxydeoxyguanosine. A marker of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus. *FEBS Lett* 1994;348(2):131–8.
56. Maeshima E, Liang XM, Otani H, Mune M, Yukawa S. Effect of environmental changes on oxidative deoxyribonucleic acid (DNA) damage in systemic lupus erythematosus. *Arch Environ Health* 2002;57:425–428.
57. Sun YX, Hu SJ, Zhang XH, Sun J, Zhu CH, Zhang ZJ. Plasma levels of vWF and NO in patients with metabolic syndrome and their relationship with metabolic disorders. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2006;35:315-318.

Table 1: Clinical and laboratory characteristics in patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE).

Characteristics	SLE n = 203	Percentage (%)
Age at onset of disease (years)	32.0 (22.0-41.0)	---
Disease duration (years)	9.0 (4.0-14.0)	---
ANA Positive (\geq 1:160)	145	71,4
ANA pattern		
Nuclear speckled	75	52
Nuclear homogeneous	51	35
Others*	19	13
Anti-dsDNA Positive (\geq 20 IU/mL)	103	51
SLEDAI \geq 6	50	25
Therapies		
Corticosteroids (Y/N)	196/7	97/3
Corticosteroids (mg/day)	7.5 (5.0-20.0)	
Immunosuppressors (Y/N)	84/119	41/59
Anti-malarial (Y/N)	144/59	71/29

Data were expressed as absolute number (n) and percentage (%) or median and interquartile range (25%-75%); Categorical variables were analyzed using a chi-square test with Yates correction (or Fisher Exact test when appropriate); SLE, systemic lupus erythematosus; ANA, antinuclear antibodies; anti-dsDNA, antibodies against double-stranded DNA; SLEDAI, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; *Others: Nuclear Centromere, Nucleolar, and Citoplasmic patterns.

Table 2: Oxidative stress markers in patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and controls

Parameters	Controls n = 188	SLE n = 203	P value
Gender (F/M)*	174/14	190/13	0.684
Ethnicity (C/NC)*	144/14	133/70	0.016
Age (years)	37.0 (29.0-46.0)	41.0 (31.0-51.0)	0.006
BMI (kg/m ²)	24.36 (21.78-27.48)	27.17 (23.78-31.13)	<0.0001
Hydroperoxides (cpm) [#]	13600 (10606-17251)	17892 (13026-24857)	<0.0001
DNA/RNA oxi (pg/mL) [#]	5489.8 (4478.9-7067.8)	5913.1 (4718.5-7691.7)	0.481
AOPP (umol/L of chloramines-T equivalents) [#]	135.42 (100.38-174.07)	155.83 (121.19-211.50)	<0.0001
TRAP (μM Trolox/UA mg/dL) [#]	177.11 (145.19-209.49)	134.62 (112.34-161.71)	<0.0001
NOx (uM) [#]	28.71 (14.74-46.54)	21.64 (13.50-41.00)	0.017

*Chi-square test. Data were expressed by absolute number. Mann-Whitney test. Data were expressed by median (25%-75%). [#]Adjustment for ethnicity, age, and BMI. F, female; M, male; C, caucasian; NC, not caucasian; BMI, body mass index; DNA/RNA oxi: DNA/RNA oxidation damage products; AOPP, Advanced Oxidation Protein Products; TRAP, Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter; UA, uric acid; NOx, Nitric Oxide metabolites.

Table 3: Binary logistic regression between Systemic Lupus Erythematosus (SLE) presence and explanatory variables.

	p	OR	CI 95%	
Hydroperoxides	0.004	1.000	1.000	1.000
AOPP	0.030	1.004	1.000	1.007
NOx	0.595	0.997	0.986	1.008
TRAP	<0.0001	0.983	0.981	0.987
Age	0.936	0.999	0.979	1.019
Ethnicity	0.204	1.409	0.830	2.391
BMI	0.003	1.083	1.027	1.141

AOPP, Advanced Oxidation Protein Products; NOx, Nitric Oxide metabolites; TRAP, Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter; BMI, body mass index.

Table 4: Oxidative stress, clinical and laboratory characteristics of patients with active (SLEDAI \geq 6) and inactive (SLEDAI $<$ 6) Systemic Lupus Erythematosus (SLE)

Parameters	Inactive n = 153	Active n = 50	P value
Gender (F/M)*	140/13	50/0	0.033
Ethnicity (C/NC)*	104/49	29/21	0.198
Age (years)	42.0 (30.0-53.0)	38.5 (31.0-48.0)	0.366
BMI (kg/m ²)	26.34 (23.71-30.38)	28.86 (23.78-33.71)	0.066
Prednisone (mg/day)	5.0 (5.0-15.0)	10.0 (5.0-20.0)	0.067
SLEDAI	2 (0-4)	8 (6-12)	0.000
C3 (mg/dL)	117.0 (99.0-134.0)	101.0 (84.0-125.0)	0.006
C4 (mg/dL)	21.1 (15.2-26.6)	18.1 (32.8-137.9)	0.007
Anti-dsDNA (U/mL)	17.58 (6.86-54.40)	37.06 (9.25-103.08)	0.018
Hydroperoxides (cpm) #	17809 (13130-24075)	15910 (11314-25777)	0.165
DNA/RNA oxi (pg/mL) #	6335 (4873-7926)	5245 (4180-5600)	0.003
AOPP (umol/L of chloramines-T equivalents) #	148.63 (116.80-200.19)	172.79 (127.90-243.50)	0.123
TRAP (μ M Trolox/UA mg/dL) #	135.35 (110.84-172.91)	134.81 (116.47-153.53)	0.869
NOx (uM) #	27.13 (14.60-45.50)	16.63 (11.39-22.55)	<0.0001

*Fisher exact test. Chi-square test. Data were expressed by absolute number. Mann-Whitney test. Data were expressed by median (25%-75%). # Adjustment for gender, BMI and prednisone dose. F, female; M, male; C, caucasian; NC, not caucasian; BMI, body mass index; SLEDAI, SLE Disease Activity Index; C3 and C4: complements; DNA/RNA oxi: DNA/RNA oxidation damage products; AOPP, Advanced Oxidation Protein Products; TRAP, Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter; UA, uric acid; NOx, Nitric Oxide metabolites.

Table 5: Binary logistic regression between disease activity of SLE (SLEDAI ≥ 6) and oxidative stress parameters, BMI and prednisone dose.

	p	OR	CI 95%	
DNA/RNA oxi	0.021	1.000	0.999	1.000
NOx	<0.0001	0.943	0.913	0.974
Gender	0.999	0.000	0.000	0.000
BMI	0.004	1.115	1.035	1.202
Prednisone	0.011	1.053	1.012	1.095

DNA/RNA oxi: DNA/RNA oxidation damage products; NOx, Nitric Oxide metabolites; BMI, body mass index.

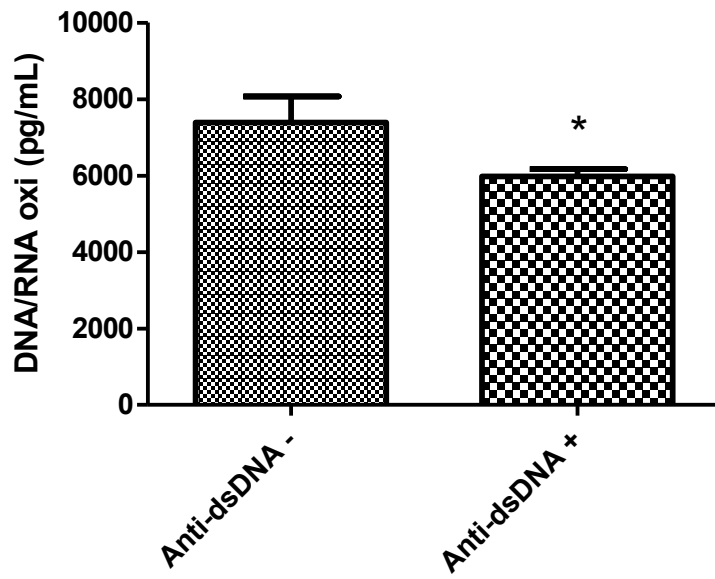


Figure 1: DNA/RNA oxidation products in systemic lupus erythematosus patients with (+) or without (-) anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA). *p=0.0350

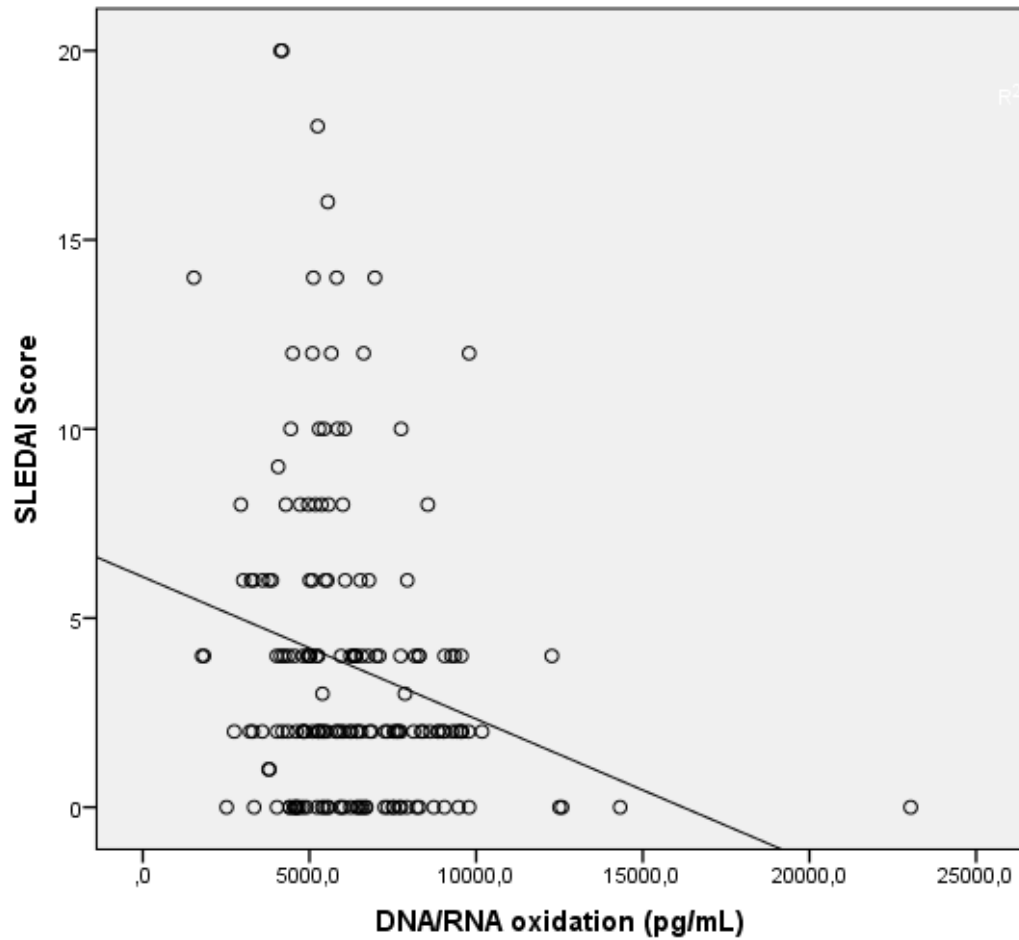


Figure 2: Linear regression between Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Disease Activity Index (SLEDAI) scores and levels of DNA/RNA oxidation products in patients with active SLE ($r^2= 0.051$; $p=0.002$).

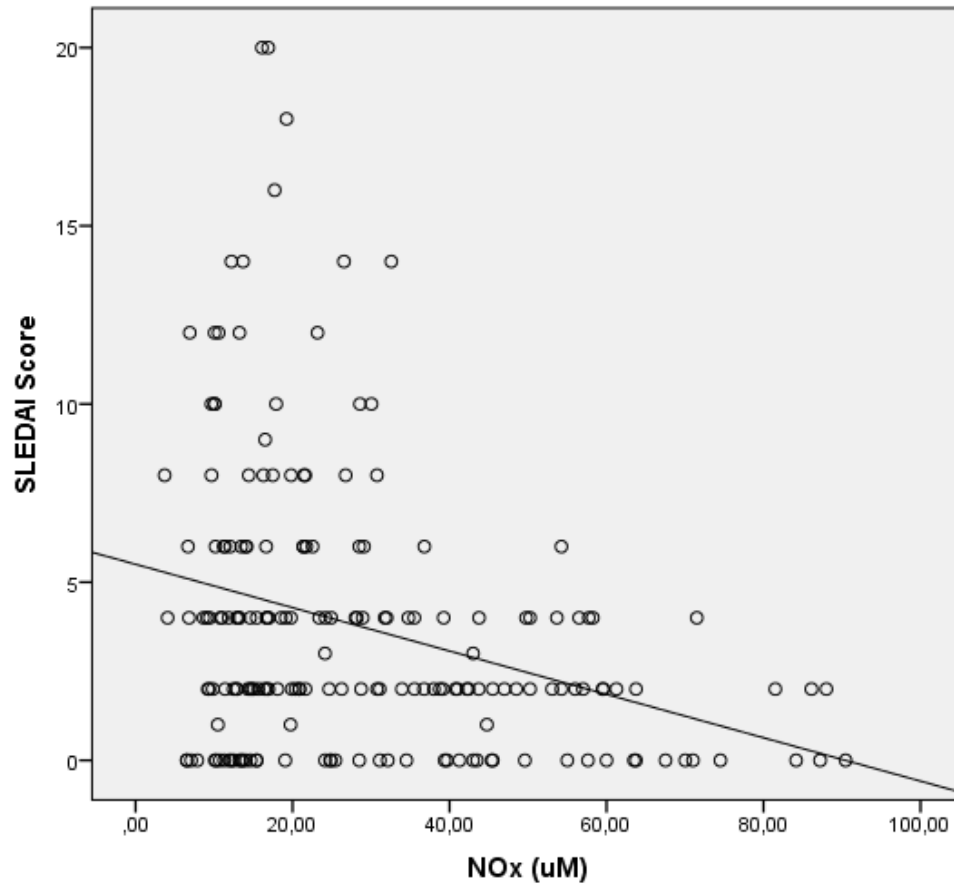


Figure 3: Linear regression between Systemic Lupus Erythematosus (SLE) Disease Activity Index (SLEDAI) scores and levels of NO metabolites in patients with active SLE ($r^2=0.091$; $p<0.0001$).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse trabalho nos permitem concluir que:

- Pacientes com LES apresentam desequilíbrio redox comparado com indivíduos saudáveis;
- Os níveis plasmáticos de Hidroperóxidos e AOPP foram diretamente e o TRAP, inversamente associados à presença de LES, independentemente da idade, etnia e IMC.
- Os produtos de oxidação de DNA/RNA e NOx foram inversamente associados à atividade da doença pelo SLEDAI, independentemente do sexo, IMC e da dose de prednisona utilizada. Esses dois marcadores podem ser utilizados como preditores de atividade da doença.
- Os níveis de NOx e DNA/RNA oxidado contribuem em 9% e 5%, respectivamente para a alteração do escore SLEDAI.

REFERÊNCIAS

- ABOU-RAYA, A.; HALLOUS, D.; FAYED, H. 8-Isoprostaglandin F2 alpha: a potential index of lipid peroxidation in systemic lupus erythematosus. **Clin Invest Med**, v. 27, p. 306–311, 2004.
- ABU-SHAKRA, M.; GLADMAN, D. D.; UROWITZ, M. B. Mortality studies in SLE: how far can we improve survival of patients with SLE. **Autoimmun Rev**, v. 3, p. 418–20, 2004.
- AHMAD, J.; ASHOK, B. T.; ALI, R. Detection of oxidative DNA damage by a monoclonal antibody: role of lysyl residues in antigen binding. **Immunol Lett**, v. 62, p. 87–92, 1998.
- AHSAN, H. 3-Nitrotyrosine: a biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. **Hum Immunol**, v. 74, p. 1392–1399, 2013.
- AHSAN, H.; ALI, A.; ALI, R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. **Clin Exp Immunol**, v. 131, p. 398–404, 2003.
- ALARCÓN, G. S. et al. Baseline characteristics of a multiethnic lupus cohort: PROFILE. **Lupus**, v. 11, p. 95–101, 2002.
- ALARCÓN, G. S. et al. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic cohort: LUMINA XXXV. Predictive factors of high disease activity over time. **Ann Rheum Dis**, v. 65, p. 1168–74, 2006.
- AL-SHOBAILI, H. A. et al. Antibodies against 4-hydroxy-2-nonenal modified epitopes recognized chromatin and its oxidized forms: role of chromatin, oxidized forms of chromatin and 4-hydroxy-2-nonenal modified epitopes in the etiopathogenesis of SLE. **Dis Markers**, v. 33, p. 19–34, 2012.
- AMARILYO, G. et al. IL-17 promotes murine lupus. **J Immunol**, v. 193, p. 540–543, 2014.
- ANOLIK, J. H. B cell biology and dysfunction in SLE. **Bull NYU Hosp Jt Dis**, v. 65, n. 3, p. 182–6, 2007.
- ARA, J.; ALI, R. **Immunol Lett**, v. 34, p. 195–200, 1994.
- ARBUCKLE, M. R. et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. **N Engl J Med**, v. 349, p. 1526–33, 2003.
- AVALOS, I. et al. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to disease activity and symptoms. **Lupus**, v. 16, p. 195–200, 2007.
- BARBHAIYA, M.; BERMAS, B. L. Evaluation and management of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis during pregnancy. **Clin Immunol**, v. 149, p. 225–235, 2013.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev Nutr**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BASHIR, S. et al. **Ann Rheum Dis**, v. 52, p. 659–666, 1993.

BELMONT, H. M. et al. Increased nitric oxide production accompanied by the up-regulation of inducible nitric oxide synthase in vascular endothelium from patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 40, n. 10, p. 1810–1816, 1997.

BEN MANSOUR, R. et al. Enhanced reactivity to malondialdehyde-modified proteins by systemic lupus erythematosus autoantibodies. **Scand J Rheumatol**, v. 39, p. 247–253, 2010.

BERNIER, M. et al. Combined oral contraceptive use and the risk of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 61, p. 476–481, 2009.

BEYER, C.; PISETSKY, D. S. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. **Nat Rev Rheumatol**, v. 6, n. 1, p. 21–9, 2010.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Rev Nutr**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIZZARO, N. et al. Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker than anti-dsDNA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and a study of metanalysis. **Autoimmun Rev**, v. 12, n. 2, p. 97-106, 2012.

BJORNADAL, L. et al. Cardiovascular disease a hazard despite improved prognosis in patients with systemic lupus erythematosus: results from a Swedish population based study 1964-95. **J Rheumatol**, v. 31, p. 713–9, 2004.

BLOUNT, S. et al. Reactive oxygen species modify human DNA, eliciting a more discriminating antigen for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. **J Clin Exp Immunol**, v. 81, n. 3, p. 384 –389, 1990.

BLOUNT, S.; GRIFFITHS, H. R.; LUNEC, J. Reactive oxygen species induce antigenic changes in DNA. **FEBS Lett**, v. 245, p. 100–4, 1989.

BOMBARDIER, C. et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. **Arthritis Rheum**, v. 35, n. 6, p. 630-40, 1992.

BOULE, M. W. et al. Toll-like receptor 9- dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin- immunoglobulin G complexes. **J Exp Med**, v. 199, p. 1631–1640, 2004.

BOUTS, Y. M. et al. Apoptosis and NET formation in the pathogenesis of SLE. **Autoimmunity**, v. 45, p. 597–601, 2012.

BUYON, J. P. et al. The effect of combined estrogen and progesterone hormone replacement therapy on disease activity in systemic lupus erythematosus: a randomized trial. **Ann Intern Med**, v. 142, p. 953–962, 2005.

CARRENO, L. et al. Immunological and clinical differences between juvenile and adult

onset of systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 8, p. 287–92, 1999.

CASCIOLA-ROSEN, L. A.; ANHALT, G.; ROSEN, A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. **J Exp Med**, v. 179, n. 4, p. 1317–30, 1994.

CECCHINI, R.; ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B. The action of hydrogen peroxide on the formation of thiobarbituric acid-reactive material from microsomes or from DNA damage by bleomycin or o-phe- nanthroline. Artefacts in the thiobarbituric acid test. **Free Rad Res Commun**, v. 10, p. 245–258, 1990.

CERVERA, R. et al. European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. **Medicine (Baltimore)**, v. 82, n. 5, p. 299-308, 2003.

CHABBERT-BUFFET, N. et al. Pregnane progestin contraception in systemic lupus erythematosus: a longitudinal study of 187 patients. **Contraception**, v. 83, p. 229–237, 2011.

CHAKRAVARTY, E. F. et al. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. **Arthritis Rheum**, v. 56, p. 2092-94, 2007.

CHANG, A. et al. In situ B cell-mediated immune responses and tubulointerstitial inflammation in human lupus nephritis. **J Immunol**, v. 186, p. 1849–1860, 2011.

CHANG, D. M. et al. Dehydroepiandrosterone treatment of women with mild-to-moderate systemic lupus erythematosus: a multicenter randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis Rheum**, v. 46, p. 2924–7, 2002.

COOKE, M. S. et al. Immunogenicity of DNA damaged by ROS implications for anti-DNA antibodies in lupus. **Free Radical Biol Med**, v. 22, p.151–159, 1997.

COOPER, G. S. et al. Differences by race, sex and age in the clinical and immunologic features of recently diagnosed systemic lupus erythematosus patients in the southeastern United States. **Lupus**, v. 11, p. 161–7, 2002.

CORAPI, K. M.; DOOLEY, M. A.; PENDERGRAFT, W. F. Comparison and evaluation of lupus nephritis response criteria in lupus activity indices and clinical trials. **Arthritis Res Ther**, v. 17, n. 1, p. 110, 2015.

COSTENBADER, K. et al. Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. **Arthritis Rheum**, v. 56, p.1251–1262, 2007.

CRAFT, J. E. Dissecting the immune cell mayhem that drives lupus pathogenesis. **Sci Transl Med**, v. 3, p. 73-79, 2011.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin Chim Acta**, v. 329, p. 23–38, 2003.

DELLAVANCE, A.; LESER, P. G.; ANDRADE, L. E. C. Antibody Test as Tool in Clinical Practice. **Rev Bras Reumatol**, v. 47, n.4, p. 265-275, 2007.

DIAMOND, B. et al. The role of somatic mutation in the pathogenic anti-DNA response. **Annu Rev Immunol**, v. 10, p. 731–757, 1992.

DIEKER, J. W.; VAN DER VLAG, J.; BERDEN, J. H. Deranged removal of apoptotic cells: its role in the genesis of lupus. **Nephrol Dial Transplant**, v. 19, p. 282–285, 2004.

DIEKER, J. W.; VAN DER VLAG, J.; BERDEN, J. H. Triggers for anti-chromatin autoantibody production in SLE. **Lupus**, v. 11, p. 856–864, 2002.

DIXIT, K.; ALI, R. Role of nitric oxide modified DNA in the etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 13, p. 95–100, 2004.

EVANS, M. D. et al. Aberrant processing of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 273, p. 894–898, 2000.

FEI, Y. et al. Death causes and pathogens analysis of systemic lupus erythematosus during the past 26 years. **Clin Rheumatol**, v. 33, n. 1, p. 57-63, 2014.

FLECHA, B. G.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Rad Biol Med**, v. 10, p. 93–100, 1991.

FORGER, F. et al. Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis. **Lupus**, v. 13, n. 1, p. 36-44, 2004.

FORMIGA, F. et al. Mild presentation of systemic lupus erythematosus in elderly patients assessed by SLEDAI. **Lupus**, v. 8, p. 462–5, 1999.

FRANSEN, J. H. et al. Both early and late apoptotic blebs are taken up by DC and induce IL-6 production. **Autoimmunity**, v. 42, p. 325–327, 2009a.

FRANSEN, J. H. et al. Mouse dendritic cells matured by ingestion of apoptotic blebs induce T cells to produce interleukin-17. **Arthritis Rheum**, v. 60, p. 2304–2313, 2009c.

FRANSEN, J. H. et al. The role of apoptosis and removal of apoptotic cells in the genesis of systemic lupus erythematosus. **Arch Med Sci**, v. 5, p. S466-S477, 2009b.

FREIRE, E. A. M.; SOUTO, L. M.; CICONELLI, R. M. Medidas de avaliação em lúpus eritematoso sistêmico. **Rev Bras Reumatol**, v. 51, n. 1, p. 70-80, 2011.

FURUSU, A. et al. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in human glomerulonephritis. **Kidney Int**, v. 53, p. 1760–1768, 1998.

FÜST, G. The role of the Epstein-Barr virus in the pathogenesis of some autoimmune disorders— similarities and differences. **Eur J Microbiol Immunol**, v. 1, n. 4, p. 267–78, 2011.

- GARCIA-ROMO, G. S. et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. **Sci Transl Med**, v. 3, p. 73ra20, 2011.
- GARRETT-SINHA, L. A.; JOHN, S.; GAFFEN, S. L. IL-17 and the Th17 lineage in systemic lupus erythematosus. **Curr Opin Rheumatol**, v. 20, p. 519–525, 2008.
- GILES B. M.; BOACKLE, S. A. Linking complement and anti-dsDNA antibodies in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Immunol Res**, v. 55, p.10-21, 2013.
- GILKESON, G. et al. Correlation of serum measures of nitric oxide production with lupus disease activity. **J Rheumatol**, v. 26, p. 318–324, 1999.
- GLADMAN, D. D.; IBAÑEZ, D.; UROWITZ, M. B. Systemic lupus erythematosus disease activity index 2000. **J Rheumatol**, v. 29, p. 288-91, 2002.
- GONZALES, C. et al. Anti-nucleosome, anti-chromatin, anti-dsDNA and anti-histone antibody reactivity in systemic lupus erythematosus. **Clin Chem Lab Med**, v. 42, p. 266-72, 2004.
- GONZALEZ-CRESPO, M. R. et al. Prospective study of serum and urinary nitrate levels in patients with systemic lupus erythematosus. **British Journal of Rheumatology**, v. 37, p. 972–977, 1998 .
- GRAMMER, A. C.; LIPSKY, P. E. B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Res Ther**, v. 5, Suppl. 4, p. S22–7, 2003.
- GRIFFITHS, B.; MOSCA, M.; GORDON, C. Assessment of patients with systemic lupus erythematosus and the use of lupus disease activity indices. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v. 19, n. 5, p. 685-708, 2005.
- GRONDAL, G. et al. Cytokine production, serum levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol**, v. 18, p. 565–70, 2000.
- HABIB MOINUDDIN, S.; ALI, R. Peroxynitrite-modified DNA: a better antigen for systemic lupus erythematosus anti-DNA autoantibodies. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 43, p. 65–70, 2006.
- HAKKIM, A. et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, n. 21, p. 9813–8, 2010.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **Am J Med**, v. 91, p. 14S–22S, 1991.
- HO, C. Y. et al. Elevated plasma concentrations of nitric oxide, soluble thrombomodulin and soluble vascular cell adhesion molecule-1 in patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology (Oxford)**, v. 42, p. 117–122, 2003.
- HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 40, p.1725, 1997.

HOUSSIAU, F. A. et al. Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. **Lupus**, v. 4, p. 393–5, 1995.

HUGHES, G. C.; CHOUBEY, D. Modulation of autoimmune rheumatic diseases by oestrogen and progesterone. **Nat Rev Rheumatol**, v. 10, p. 740–751, 2014.

ILLEI, G. G. et al. Biomarkers in systemic lupus erythematosus. I. General overview of biomarkers and their applicability. **Arthritis Rheum**, v. 50, p. 1709, 2004.

JACOBSON, D. L. et al. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 84, p. 223–243, 1997.

JEONG, S. J. et al. Incidence and risk factors of infection in a single cohort of 110 adults with systemic lupus erythematosus. **Scand J Infect Dis**, v. 41, n. 4, p. 268–74, 2009.

JOHNSON, A. E. et al. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. **Arthritis Rheum**, v. 38, p. 551–8, 1995.

JOLLY, M. Pitfalls and opportunities in measuring patient outcomes in lupus. **Curr Rheumatol Rep**, v. 12, p. 229, 2010.

JOVANOVIC, V. et al. Lipid anti-lipid antibody responses correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus. **PLoS One**, v. 8, p. e55639, 2013.

KANDA, N.; TSUCHIDA, T.; TAMAKI, K. Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 42, p. 328–37, 1999.

KANDA, N.; TSUCHIDA, T.; TAMAKI, K. Testosterone inhibits immunoglobulin production by human peripheral blood mononuclear cells. **Clin Exp Immunol**, v. 106, p. 410–15, 1996.

KANDA, N.; TSUCHIDA, T.; TAMAKI, K. Testosterone suppresses anti-DNA antibody production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 40, p. 1703–11, 1997.

KAPLAN, M. J. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. **Nat Rev Rheumatol**, v. 7, p. 691–699, 2011.

KAVANAUGH, A. F. et al. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests. **Arthritis Rheum**, v. 47, n. 5, p. 546–555, 2002.

KHAN, F.; ALI, R. Antibodies against nitric oxide damaged poly I-tyrosine and 3-nitrotyrosine levels in systemic lupus erythematosus. **J Biochem Mol Biol**, v. 39, p. 189–196, 2006.

KIM, S. J. et al. Tolerogenic function of Blimp-1 in dendritic cells. **J Exp Med**, v. 208, p.

2193–2199, 2011.

KISS, E. et al. CR1 density polymorphism and expression on erythrocytes of patients with systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v. 25, p. 53–8, 1996.

KONO, H. et al. FcγRIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. **Hum Mol Genet**, v.14, n. 19, p. 2881–92, 2005.

KUHN, A. et al. Aberrant timing in epidermal expression of inducible nitric oxide synthase after UV irradiation in cutaneous lupus erythematosus. **J Invest Dermatol**, v. 111, n. 1, p. 149–153, 1998.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens. **Autoimmun Rev**, v. 7, p. 567–573, 2008.

LALWANI, P. et al. Serum thiols as a biomarker of disease activity in lupus nephritis. **PLoS One**, 10, n. 3, p. e0119947, 2015.

LANDE, R. et al. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. **Sci Transl Med**, v. 3, p. 73ra19, 2011.

LEE, H. T. et al. Increased 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in plasma and decreased mRNA expression of human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1, anti-oxidant enzymes, mitochondrial biogenesis-related proteins and glycolytic enzymes in leucocytes in patients with systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Immunol**, v. 176, n. 1, p. 66–77, 2014.

LEVESQUE, M. C.; WEINBERG, J. B. The dichotomous role of nitric oxide in the pathogenesis of accelerated atherosclerosis associated with systemic lupus erythematosus. **Curr Mol Med**, v. 4, p. 777–786, 2004.

LI, R. et al. Adiponectin improves endothelial function in hyperlipidemic rats by reducing oxidative/nitrative stress and differential regulation of eNOS/iNOS activity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 293, n. 6, p. E1703-8, 2007.

LIN, L. Y. et al. Nitric oxide production is paradoxically decreased after weight reduction surgery in morbid obesity patients. **Atherosclerosis**, v. 190, p. 436-442, 2007.

LINNIK, M. D. et al. Relationship between anti-double-stranded DNA antibodies and exacerbation of renal disease in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthr Rheum**, v. 52, n. 4, p. 1129-37, 2005.

LISNEVSKAIA, L.; MURPHY, G.; ISENBERG, D. Systemic lupus erythematosus. **Lancet**, v. 384, n. 9957, p. 1878-88, 2014.

LIU, C. C. et al. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. **Ther Adv Musculoskelet Dis**, v. 5, p. 210, 2013.

- LIVA, S. M.; VOSKUHL, R. R. Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production. **J Immunol**, v. 167, p. 2060–2067, 2001.
- LOZOVOY, M. A. B. et al. Hypertension is associated with serologically active disease in patients with systemic lupus erythematosus: role of increased Th1/Th2 ratio and oxidative stress. **Scand J Rheumatol**, v. 43, p. 59–62, 2014.
- LOZOVOY, M. A. B. et al. Oxidative stress is associated with liver damage, inflammatory status, and corticosteroid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 20, n. 12, p. 1250–9, 2011.
- LOZOVOY, M. A. B. et al. Relationship between iron metabolism, oxidative stress, and insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus. **Scand J Rheumatol**, v. 42, p. 303–310, 2013.
- LUNEC, J. et al. 8-Hydroxydeoxyguanosine. A marker of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus. **FEBS Lett**, v. 348, p. 131–138, 1994.
- MACKAY, F.; SILVEIRA, P. A.; BRINK, R. B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-forward on autoimmunity and signaling. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 3, p. 327–36, 2007.
- MAESHIMA, E. et al. Effect of environmental changes on oxidative deoxyribonucleic acid (DNA) damage in systemic lupus erythematosus. **Arch Environ Health**, v. 57, n. 425–428, 2002.
- MANSON, J. J. et al. Relationship between anti-dsDNA, anti-nucleosome and anti-alpha-actinin antibodies and markers of renal disease in patients with lupus nephritis: a prospective longitudinal study. **Arthritis Res Ther**, v. 11, n. 5, p. R154, 2009.
- MANSOUR, R. B. et al. Increased levels of autoantibodies against catalase and superoxide dismutase associated with oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Scand J Rheumatol**, v. 37, p. 103–108, 2008.
- MASSABKI, P. S. et al. Clinical implications of autoantibodies in HIV infection. **AIDS**, v. 11, p. 1845–50, 1997.
- MCCARTY, D. J. et al. Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. **Arthritis Rheum**, v. 38, p. 1260–70, 1995.
- MCCURDY, D. et al. Delayed repair of DNA damage by ionizing radiation in cells from patients with juvenile systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Radiat Res**, v. 147, n. 1, p. 48–54, 1997.
- MIGLIORINI, P. et al. Anti-Sm and anti-RNP antibodies. **Autoimmunity**, v. 38, p. 47–54, 2005.
- MIR, A. et al. C3b receptor (CR1) on phagocytic cells from SLE patients: analysis of the defect and familial study. **Clin Exp Immunol**, v. 73, p. 461–6, 1988.
- MOHAN, C.; PUTTERMAN, C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus

- erythematosus and lupus nephritis. **Nat Rev Nephrol**, v. 11, p. 329–341, 2015.
- MOK, C. C.; LAU, C. S. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **J Clin Pathol**, v. 56, n. 481–490, 2003.
- MOK, C. C.; LAU, C. S. Profile of sex hormones in male patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 9, p. 252–7, 2000.
- MORGAN, P. E. et al. Serum protein oxidation and apolipoprotein CIII levels in people with systemic lupus erythematosus with and without nephritis. **Free Radic Res**, v. 41, p. 1301–1312, 2007.
- MORGAN, P. E.; STURGESS, A. D.; DAVIES, M. J. Evidence for chronically elevated serum protein oxidation in systemic lupus erythematosus patients. **Free Radic Res**, v. 43, p. 117–127, 2009.
- MORTENSEN, E. S., REKVIG, O. P. Nephritogenic potential of anti- DNA antibodies against necrotic nucleosomes. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, p. 696–704, 2009.
- MORTENSEN, E. S.; FENTON, K. A.; REKVIG, O. P. Lupus nephritis: the central role of nucleosomes revealed. **Am J Pathol**, v. 172, p. 275–283, 2008.
- MOSS, K. E. et al. Outcome of a cohort of 300 patients with systemic lupus erythematosus attending a dedicated clinic for over two decades. **Ann Rheum Dis**, v. 61, p. 409–13, 2002.
- MOULTON, V. R.; TSOKOS, G. C. Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**, v. 13, p. 207, 2011.
- MUNOZ, L. E. et al. Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 17, p. 371–375, 2008.
- MUNOZ, L. E. et al. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. **Nat Rev Rheumatol**, v. 6, p. 280–289, 2010.
- NAKASHIMA, C. A. K. et al. Incidence and clinical-laboratory aspects of systemic lupus erythematosus in a Southern brazilian city. **Rev Bras Reumatol**, v. 51, n. 3, p. 235-239, 2011.
- NASHI, E.; WANG, Y.; DIAMOND, B. The Role Of B Cells in Lupus Pathogenesis. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 4, p. 543–550, 2010.
- NEUBERT, K. et al. The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. **Nat Med**, v. 14, p. 748–755, 2008.
- NORDMARK, G. et al. Effects of dehydroepiandrosterone supplement on health-related quality of life in glucocorti- coid treated female patients with systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v. 38, p. 531–40, 2005.
- NUTTALL, S. L. et al. Cardiovascular risk in systemic lupus erythematosus—evidence of

increased oxidative stress and dyslipidaemia. **Rheumatology**, v. 42, p. 758–762, 2003.

OATES, J. C. The biology of reactive intermediates in systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v. 43, p. 56–63, 2010.

OATES, J. C. et al. Association of serum nitrate and nitrite levels with longitudinal assessments of disease activity and damage in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 1, p. 263–272, 2008.

OATES, J. C. et al. Prospective measure of serum 3-nitrotyrosine levels in systemic lupus erythematosus: correlation with disease activity. **Proc. Assoc. Am. Physicians**, v. 111, p. 611–621, 1999.

OATES, J. C.; GILKESON, G. S. The biology of nitric oxide and other reactive intermediates in systemic lupus erythematosus. **Clin Immunol**, v.121, n. 3, p. 243–250, 2006.

OBERMOSER, G.; PASCUAL, V. The interferon-alpha signature of systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 19, p. 1012–1019, 2010.

OLIVEIRA, S. R. et al. Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: Association with the expanded disability status scale. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 321, p. 49–53, 2012.

OSTENSEN, M., VILLIGER, P. M.; FORGER, F. Interaction of pregnancy and autoimmune rheumatic disease. **Autoimmun Rev**, v. 11, p. A437–A446, 2012.

PANIS, C. et al. Trypanosoma cruzi: Effects of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. **Exp Parasitol**, v. 127, p. 58–65, 2011.

PARK, Y. B. et al. Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Rheumatol**, v. 16, p. 283–8, 1998.

PEREZ, Y. G. et al. Malondialdehyde and sulfhydryl groups as biomarkers of oxidative stress in patients with systemic lupus erythematosus. **Rev Bras Reum**, v. 52, n. 4, p. 658–60, 2012.

PETRI, M. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. **Best Pract Res Clin Rheumatol**, v.16, p. 847–858, 2002.

PETRI, M. A. et al. Effects of prasterone on disease activity and symptoms in women with active systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 50, p. 2858–68, 2004.

PETRI, M. et al. Combined oral contraceptives in women with systemic lupus erythematosus. **N Engl J Med**, v. 353, p. 2550–2558, 2005.

PETRI, M. et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 64, p. 2677, 2012.

- PISETSKY, D. S. Systemic lupus erythematosus. A. Epidemiology, pathology and pathogenesis. In: Klippel JH, ed. **Primer on the rheumatic diseases**, 11th ed. Georgia, USA: Arthritis Foundation, 1997, p. 246–51.
- PODOLSKA, M. J. et al. Inflammatory etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus: an update. **Journal of Inflammation Research**, v. 8, p. 161-171, 2015.
- PONS-ESTEL, B. A. et al. The GLADEL multinational Latin American prospective inception cohort of 1,214 patients with systemic lupus erythematosus: ethnic and disease heterogeneity among “Hispanics”. **Medicine (Baltimore)**, v. 83, p. 1–17, 2004.
- PONS-ESTEL, G. J. et al. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. **Semin Arthritis Rheum**, v. 39, p. 257, 2010.
- PU, S. J. et al. The clinical features and prognosis of lupus with disease onset at age 65 and older. **Lupus**, v. 9, p. 96–100, 2000.
- REKVIG, O. P.; VAN DER VLAG, J. The pathogenesis and diagnosis of systemic lupus erythematosus: still not resolved. **Semin Immunopathol** 36:301–311, 2014.
- REPETTO, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clin Chim Acta**, v. 255, p. 107–17, 1996.
- RIBOLDI, P. et al. Anti-DNA antibodies: a diagnostic and prognostic tool for systemic lupus erythematosus? **Autoimmunity**. Feb;38(1):39-45, 2005.
- ROKEACH, I. A.; HOCH, S. O. B-cell epitopes of Sm autoantigens. **Mol Biol Reports**, v. 16, p. 165-74, 1992.
- RONNBLOM, L.; ALM, G. V.; ELORANTA, M. L. Type I interferon and lupus. **Curr Opin Rheumatol**, v. 21, p. 471–477, 2009.
- SAMANTA, A. et al. High prevalence of systemic disease and mortality in Asian subjects with systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, v. 50, p. 490– 2, 1991.
- SANCHEZ-GUERRERO, J. et al. A trial of contraceptive methods in women with systemic lupus erythematosus. **N Engl J Med**, v. 353, p. 2539–2549, 2005.
- SATO, E. I. et al. Estudo da reprodutibilidade e validade do índice de atividade do lupus eritematoso sistêmico. **Rev Bras Reumatol**, v. 31, n. 4, p. 133-6, 1991.
- SEGAL, B. M. et al. Oxidative stress and fatigue in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 21, p. 984–992, 2012.
- SHAH, D. et al. Altered redox state and apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Immunobiology**, v. 218, p. 620–627, 2013b.
- SHAH, D. et al. Association between T lymphocyte sub-sets apoptosis and peripheral blood mononuclear cells oxidative stress in systemic lupus erythematosus. **Free Radic Res**, v. 45, p. 559–567, 2011.

SHAH, D. et al. **Crosstalk Between Oxidative Stress, Autophagy and Cell Death — Pathogenesis of Autoimmune Disease, Autoimmunity - Pathogenesis, Clinical Aspects and Therapy of Specific Autoimmune Diseases**, Dr. Katerina Chatzidionysiou (Ed.), 2015. Available from: <http://www.intechopen.com/books/autoimmunity-pathogenesis-clinical-aspects-and-therapy-of-specific-autoimmune-diseases/crosstalk-between-oxidative-stress-autophagy-and-cell-death-pathogenesis-of-autoimmune-disease>. Acesso em 09 nov.15.

SHAH, D. et al. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. **J Biomed Sci**, v. 21, n. 1, p. 23, 2014.

SHAH, D. et al. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to Th1 cytokine and disease activity. **Immunol Lett**, v. 129, p. 7–12, 2010a.

SHAH, D.; SAH, S.; NATH, S. K. Interaction between glutathione and apoptosis in systemic lupus erythematosus. **Autoimmun Rev**, v. 12, p. 741–751, 2013a.

SHAH, K. et al. Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Res Ther**, v. 12, p. R53, 2010b.

SHARMA, A.; ISENBERG, D. A.; DIAMOND, B. Crossreactivity of human anti-dsDNA antibodies to phosphorylcholine: clues to their origin. **J Autoimmun**, v. 16, n. 4, p. 479–84, 2001.

SHLOMCHIK, M. J.; CRAFT, J. E.; MAMULA, M. J. From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. **Nat Rev Immunol**, v. 1, p. 147–153, 2001.

SIMÃO, A. N. C. et al. Immunological and biochemical parameters of patients with metabolic syndrome and the participation of oxidative and nitroactive stress. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, p. 707-712, 2011.

SIMÃO, A. N. C. et al. Influence of uric acid and g-glutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. **Nutrition**, v. 24, p. 675–681, 2008.

SIMARD, J. F.; COSTENBADER, K. H. What can epidemiology tell us about systemic lupus erythematosus? **Int J Clin Pract**, v. 61, p. 1170–1180, 2007.

SOUZA, D. C.; SANTO, A. H.; SATO, E. I. Mortality profile related to systemic lupus erythematosus: a multiple cause-of-death analysis. **J Rheumatol**, v. 39, n. 3, p. 496-503, 2012.

STRAUB, R. H. et al. Renal clearance and daily excretion of cortisol and adrenal androgens in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, v. 63, p. 961–8, 2004.

SULEIMAN, S. et al. Anti-nucleosome antibodies as a disease activity marker in patients with systemic lupus erythematosus. **Int J Rheum Dis**, v. 12, n. 2, p. 100-6, 2009.

SULLIVAN, K. E. Genetics of systemic lupus erythematosus. Clinical implications. **Rheum**

Dis Clin North Am, v. 26, p. 229–56, 2000.

TAO, L. et al. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress. **Circulation**, v. 115, n. 11, p. 1408-16, 2007.

TAN, E. M. et al.: Range of antinuclear antibodies in “healthy” individuals. **Arthritis Rheum**, v. 40, p. 1601-11, 1997.

TER BORG, E. J. et al. Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study. **Arthritis Rheum**, v. 33, p. 634, 1990.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. **Blood**, v. 84, p. 4008–27, 1994.

TRUEDSSON, L.; BENGTSSON, A. A.; STURFELT, G. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v. 40, n. 8, p. 560-6, 2007.

TSUBATA, T.; HONJO, T. B cell tolerance and autoimmunity. **Rev Immunogenet**, v. 2, n. 1, p. 18–25, 2000.

TURGAY, M. et al. Oxidative stress and antioxidant parameters in a Turkish group of patients with active and inactive systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol**, v. 10, p. 101–106, 2007.

TURI, S. et al. Oxidative stress and antioxidant defense mechanism in glomerular diseases. **Free Radic Biol Med**, v. 22, p. 161–168, 1997.

TYRRELL-PRICE, J.; LYDYARD, P. M.; ISENBERG, D. A. The effect of interleukin-10 and of interleukin-12 on the in vitro production of anti-double-stranded DNA antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Immunol**, v. 124, p. 118–25, 2001.

VAN VOLLENHOVEN, R. F. et al. Treatment of systemic lupus erythematosus with dehydroepiandrosterone: 50 patients treated up to 12 months. **J Rheumatol**, v. 25, p. 285–9, 1998.

VENTURINI, D. et al. Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. **Obesity (Silver Spring)**, v. 20, p. 2361–6, 2012.

VIEIRA, C. S. et al. Tibolone in postmenopausal women with systemic lupus erythematosus: a pilot study. **Maturitas**, v. 62, p. 311–316, 2008.

VILAR, M. J.; SATO, E. I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a tropical region (Natal, Brazil). **Lupus**, v. 11, n. 8, p. 528- 32, 2002.

YANIV, G. et al. A volcanic explosion of autoantibodies in systemic lupus erythematosus: a diversity of 180 different antibodies found in SLE patients. **Autoimmun Rev**, v. 14, n. 1, p. 75–9, 2015.

- YOKOZAWA, T. et al. Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride. **J Agric Food Chem**, v. 48, p. 5068–5073, 2000.
- ZAREMBA, T.; OLINSKI, R. Oxidative DNA damage—analysis and clinical significance. **Postepy Biochem**, v. 56, p. 124–138, 2010.
- ZEN, M. et al. Hormones, immune response, and pregnancy in healthy women and SLE patients. **Swiss Med Wkly**, v. 140, p. 187–201, 2010.
- ZHANG, Q. et al. Oxidative protein damage and antioxidant status in systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Dermatol**, v. 35, p. 287–294, 2010.
- WALLACE, D. J. **Diagnosis and differential diagnosis of systemic lupus erythematosus in adults**. Disponível em: <<http://www.uptodate.com>>. Acesso em: 02 nov. 2015.
- WANCHU, A. et al. Nitric oxide synthesis is increased in patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatol Int**, v. 18, p. 41–43, 1998.
- WANG, D. et al. Ets-1 deficiency leads to altered B cell differentiation, hyperresponsiveness to TLR9 and autoimmune disease. **Int Immunol**, v. 17, p. 1179–1191, 2005.
- WANG, G. et al. Differential oxidative modification of proteins in MRL+/+ and MRL/lpr mice: increased formation of lipid peroxidation- derived aldehyde-protein adducts may contribute to accelerated onset of autoimmune response. **Free Radic Res**, v. 46, p. 1472–1481, 2012.
- WANG, G. et al. Markers of Oxidative and Nitrosative Stress in Systemic Lupus Erythematosus: Correlation with Disease Activity. **Arthritis Rheum**, v. 62, n. 7, p. 2064–72, 2010.
- WANG, J. S. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and apoptosis in human lupus nephritis. **Nephron**, v. 77, p. 404–411, 1997.
- WANG, L. C. et al. Retrospective analysis of mortality and morbidity of pediatric systemic lupus erythematosus in the past two decades. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 36, p. 203–8, 2003.
- WINKLER, T. H.; JAHN, S.; KALDEN, J. R. IgG human monoclonal anti-DNA autoantibodies from patients with systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Immunol**, v. 85, n. 3, p. 379–85, 1991.
- WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **J Immunol**, v. 161, p. 2524–2532, 1998.
- WU, D. P. et al. Selective recognition of DNA antigenic determinants by murine monoclonal anti-DNA antibodies. **Clin Exp Immunol**, v. 82, p. 33–7, 1990.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para pacientes)

Título da pesquisa:

“Associação entre polimorfismos genéticos e a susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico em pacientes atendidos no Ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa **“Associação entre polimorfismos genéticos e a susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) em pacientes atendidos no Ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná,”** realizada no “Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU/UEL), Londrina, Paraná”. O objetivo da pesquisa é “determinar se existe associação entre fatores genéticos do indivíduo e a chance de desenvolver LES e se existe associação com o quadro clínico da doença”. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: no momento da entrada no projeto de pesquisa, será realizada uma avaliação clínica e coleta de 20 mL de sangue periférico para realização de exames laboratoriais relacionados ao LES, e uma entrevista para você fornecer informações sobre estilos de vida como dieta e exercícios físicos. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos, ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

As amostras de sangue coletadas serão identificadas por códigos com letra e número garantindo o absoluto sigilo e confidencialidade dos resultados. Após sua utilização, as amostras serão armazenadas em *freezer* sob a responsabilidade do pesquisador responsável para outros estudos genéticos relacionados ao LES.

A participação no projeto não apresenta riscos ao (a) senhor (a) e a população poderá ser beneficiada com os resultados obtidos, caso a equipe de pesquisa determine fatores genéticos que possam estimar a chance de um indivíduo desenvolver a doença ou a chance de um indivíduo previamente com a doença em desenvolver quadros clínicos mais graves como a nefrite lúpica.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar: **Professora Dra. Andrea Name Colado Simão, no Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do HU/UEL, fone 43-3371-2321, e-mail: deianame@yahoo.com.br**, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 33712490.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ____ de _____ de

2012.

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Andrea Name Colado Simão

1. RG: 6226736-4

_____, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

Obs: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, deve ser incluído o campo para assinatura do menor e do responsável.

APÊNDICE B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para grupo controle)

Título da pesquisa:

“Associação entre polimorfismos genéticos e a susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico em pacientes atendidos no Ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa “Associação entre polimorfismos genéticos e a susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) em pacientes atendidos no Ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, realizada no “Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HU/UEL), Londrina, Paraná”. O objetivo da pesquisa é “Determinar se existe associação entre fatores genéticos do indivíduo e a chance de desenvolver LES e se existe associação com o quadro clínico da doença”. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma (avaliação clínica, coleta de sangue periférico para realização de exames laboratoriais relacionados ao LES, fornecer informações sobre estilos de vida como dieta e exercícios físicos. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Sua participação é importante para compor o grupo de indivíduos saudáveis que serão utilizados para a comparação dos resultados obtidos com o grupo de pacientes com a doença.

As amostras de sangue coletadas serão identificadas por códigos garantindo o absoluto sigilo e confidencialidade dos resultados. Após sua utilização, as amostras serão armazenadas em *freezer* sob a responsabilidade do pesquisador responsável por outros estudos genéticos relacionados ao LES.

A participação no projeto não apresenta riscos ao (a) senhor (a) e a população poderá ser beneficiada com os resultados obtidos, caso a equipe de pesquisa determine fatores genéticos que possam estimar a chance de um indivíduo desenvolver a doença ou a chance de um indivíduo com a doença em desenvolver quadros clínicos mais graves como a nefrite lúpica. Os resultados serão discutidos entre os pesquisadores da área e poderão contribuir para a implantação de novos exames laboratoriais possam estimar a chance de um indivíduo desenvolver a doença ou a chance de um indivíduo com a doença em desenvolver quadros clínicos mais graves como a nefrite lúpica.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar (**Professora Dra. Andrea Name Colado Simão, no Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do HU/UEL, fone 43-3371-2321, e-mail: deianame@yahoo.com.br, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 33712490.**

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ___ de _____ de

2012.

Pesquisador Responsável

RG:: _____

_____, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

Obs: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, deve ser incluído o campo para assinatura do menor e do responsável.

APÊNDICE C

Ficha de avaliação dos pacientes

NOME:	PRONTUÁRIO:
DATA NASC:	CAUCASIANO () NAO CAUC ()
END:	TEL:
MEDICAMENTOS PREDNISONA: HIDROXICLOROQUINA/CLOROQUINA: METOTREXATE: AZATIOPRINA: MICOFENOLATO MOFETIL: OUTROS IMUNOSSUPRESSORES: OUTROS:	
OUTRAS DOENÇAS: HAS SIM () NÃO () DIABETES SIM () NÃO () AVC/IAM SIM () NÃO () OUTROS:	
NEFRITE LÚPICA SIM () NÃO () OBS:	
TEMPO DE DOENÇA:	
ESCORE SLEDAI:	
TABAGISMO: SIM () NÃO ()	
ATIVIDADE FÍSICA: SIM () NÃO ()	

PESO	ALTURA	IMC	CIRC. ABDOMINAL	PRESSÃO ARTERIAL

APÊNDICE D

Ficha de avaliação dos controles

NOME:	PRONTUÁRIO:
DATA NASC:	CAUCASIANO () NAO CAUC ()
END:	TEL:
MEDICAMENTOS	
DOENÇAS: HAS SIM () NÃO () DIABETES SIM () NÃO () AVC/IAM SIM () NÃO () OUTROS:	
TABAGISMO: SIM () NÃO ()	
ATIVIDADE FÍSICA: SIM () NÃO ()	

PESO	ALTURA	IMC	CIRC. ABDOMINAL	PRESSÃO ARTERIAL

ANEXOS

ANEXO A

Escore SLEDAI - Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

A descrição deve estar presente na visita ou nos últimos 10 dias.

SLE Daily Activity Index: Data Collection Sheet

SLEDAI Score	Descriptor	Definition
8	Seizures	Recent onset. Exclude metabolic, infectious or drug causes.
8	Psychosis	Altered ability to function in normal activity due to severe disturbance in the perception of reality. Include hallucinations, incoherence, marked loose associations, impoverished thought content, marked illogical thinking, bizarre, disorganized or catatonic behavior. Exclude uremia and drug causes.
8	Organic brain syndrome	Altered mental function with impaired orientation, memory, or other intellectual function, with rapid onset and fluctuating clinical features. Include clouding of consciousness with reduced capacity to focus, and inability to sustain attention to environment, plus at least 2 of the following: perceptual disturbance, incoherent speech, insomnia or daytime drowsiness or increased or decreased psychomotor activity. Exclude metabolic, infection or drug causes.
8	Visual disturbance	Retinal changes of SLE. Include cytoid bodies, retinal hemorrhages, serous exudate or hemorrhages in the choroid or optic neuritis. Exclude hypertension, infection or drug causes.
8	Cranial nerve disorder	New onset of sensory or motor neuropathy involving cranial nerves.
8	Lupus headache	Severe, persistent headache: may be migrainous, but must be nonresponsive to narcotic analgesia.
8	CVA	New onset of cerebrovascular accident(s). Exclude arteriosclerosis.
8	Vasculitis	Ulceration, gangrene, tender finger nodules, periungual infraction, splinter hemorrhages, or biopsy or angiogram proof of vasculitis.
4	Arthritis	More than 2 joints with pain and signs of inflammation (i.e., tenderness, swelling or effusion).
4	Myositis	Proximal muscle aching/weakness, associated with elevated creatine phosphokinase/aldolase or electromyogram changes or a biopsy showing myositis.
4	Urinary casts	Heme-granular or red blood cell casts.
4	Hematuria	>5 red blood cells high power field. Exclude stone, infection or other cause.
4	Proteinuria	>0.5 gm/24 hours. New onset or recent increase of more than 0.5 gm/24 hours.
4	Pyuria	>5 white blood cells/high power field. Exclude infection.
2	New rash	New onset or recurrence of inflammatory type rash.
2	Alopecia	New onset or recurrence of abnormal, patchy or diffuse loss of hair.
2	Mucosal ulcers	New onset or recurrence of oral or nasal ulcerations.
2	Pleurisy	Pleuritic chest pain with pleural rub or effusion, or pleural thickening.
2	Pericarditis	Pericardial pain with at least 1 of the following: rub, effusion or electrocardiogram or echocardiogram confirmation.
2	Low complement	Decrease in CH50, C3 or C4 below the lower limit of normal for testing laboratory.
2	Increased DNA binding	>25% binding by Farr assay or above normal range for testing laboratory.
1	Fever	>38°C. Exclude infectious cause.
1	Thrombocytopenia	<100,000 platelets/mm ³ .
1	Leukopenia	<3,000 white blood cells/mm ³ . Exclude drug causes.

TOTAL SLEDAI SCORE: _____

ANEXO B

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL
REGIONAL DO NORTE DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre polimorfismos genéticos e a susceptibilidade ao Lúpus Eritematoso Sistêmico em pacientes atendidos no Ambulatório do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná

Pesquisador: Andréa Name Colado Simão

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 01865212.0.0000.5231

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Londrina - UEL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 210.328

Data da Relatoria: 19/12/2012

Apresentação do Projeto:

Estudos com famílias e gêmeos sugerem que os fatores genéticos desempenham um papel significativo na predisposição ao Lupus Eritematoso Sistêmico (LES). Assim, a hipótese levantada neste projeto é de que indivíduos que apresentam polimorfismo genético nos genes que codificam a Proteína C Reativa, o HLA e o TNF apresentam maior susceptibilidade ao desenvolvimento de LES e apresentam maior estresse oxidativo. Para isso, o sangue dos indivíduos selecionados será colhido para realização de investigação gênica e dosagem de Proteína C Reativa e TNF.

Objetivo da Pesquisa:

Este projeto objetiva determinar a associação de polimorfismos genéticos e a susceptibilidade ao LES e ao aumento do estresse oxidativo em pacientes atendidos no Ambulatório do Hospital de Clínicas (AHC) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto não apresenta riscos ao paciente e a população poderá ser beneficiada com os resultados obtidos, caso a equipe de pesquisa determine fatores genéticos que possam estimar a chance de um indivíduo desenvolver a doença ou a chance de um indivíduo previamente com a

Endereço: AVENIDA ROBERT KOCH, 60

Bairro: VILA OPERÁRIA

CEP: 86.038-440

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-2490

E-mail: cep268@uel.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL
REGIONAL DO NORTE DO



doença em desenvolver quadros clínicos mais graves como a nefrite lúpica. Além disso, os resultados obtidos neste estudo poderão, também, indicar uma possível relevância da inclusão na rotina laboratorial de testes de genotipagem dos

genes indicados para indivíduos atendidos no AHC e no Hospital Universitário da UEL. Indivíduos que apresentarem um genótipo ou um conjunto de haplótipos associado ao LES poderão ser beneficiados com estratégias terapêuticas diferentes ou serem submetidos a um monitoramento clínico e laboratorial em intervalos menores de tempo, ou ambos procedimentos, o que poderá contribuir para uma melhor avaliação e monitorização clínica destes indivíduos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O Projeto está bem estruturado e é relevante para o avanço das investigações sobre LES.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todas as pendências foram respondidas adequadamente.

Recomendações:

Encaminhar relatório ao final do estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezada Pesquisadora,

Favor retirar seu parecer de aprovação junto ao CEP/UEL.

Endereço: AVENIDA ROBERT KOCH, 60

Bairro: VILA OPERÁRIA

UF: PR **Município:** LONDRINA

Telefone: (43)3371-2490

CEP: 86.038-440

E-mail: cep268@uel.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL/ HOSPITAL
REGIONAL DO NORTE DO



LONDRINA, 04 de Março de 2013

Assinador por:
Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
(Coordenador)

Endereço: AVENIDA ROBERT KOCH, 60
Bairro: VILA OPERÁRIA
UF: PR **Município:** LONDRINA
Telefone: (43)3371-2490

CEP: 86.038-440

E-mail: cep268@uel.br

ANEXO C

Instruções para autores da revista Scandinavian Journal of Rheumatology

Web-based Submission System

The Scandinavian Journal of Rheumatology all new manuscripts must be submitted via the web-based manuscript submission and handling system ManuscriptCentral.

Editorial Office

Editor-in-Chief
Søren Jacobsen
Scandinavian Journal of Rheumatology
Editorial Office, Building 3A
Aarhus University Hospital
Nørrebrogade 44
DK-8000 Aarhus C
Denmark

The Editorial Office will help you with any enquiries about the journal's requirements.

Tel: + 45 8949 4411

Fax: + 45 8949 4412

E-mail: scandjrheumatol.akh.aaa.dk

General information

The *Scandinavian Journal of Rheumatology* is the official journal of the Scandinavian Society for Rheumatology. The Journal publishes original research on all aspects of clinical and experimental rheumatology. Original reports, review articles, and letters are equally welcome.

Author and Disclosure Statement

Submission of a manuscript to Scandinavian Journal of Rheumatology is understood to imply that it has not previously been published (except in abstract form) and is not being considered for publication elsewhere.

Manuscripts submitted under multiple authorship are reviewed under the assumption that: 1) all authors listed concur with the submitted version of the manuscript and with the listing of the authors; 2) authorship credit is based on important contributions in one or more of the following areas: conception and design, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript or making intellectual contribution to its content; 3) the final manuscript has been explicitly approved by the responsible authorities in the laboratory or institution where the work was carried out.

The corresponding author on behalf of all co-authors should sign a statement concerning any financial or other relationship that might lead to a conflict of interest.

Manuscript preparation

Submission items include:

- A cover letter
- The manuscript should include the title page, abstract (if required by article type), main text, references, and figure legends
- The manuscript should be formatted with a font size no smaller than 12 point. Times, Times Roman, Courier, Helvetica and Arial are the recommended fonts for the best quality conversion, and with a 2 cm margin at both sides of the text and 3 cm wide margins at the top and bottom of the page.
- Special characters and symbols, use the Symbol font.
- All abbreviations ([abbreviations](#)) must be defined.
- Files should be labeled with appropriate and descriptive file names (e.g., SmithText.doc, Fig1.tiff, Table3.doc).
- Do not upload your text as a PDF.

- Supplementary material (e.g. additional tables, figures and text files) can be published online only and is not included in the word count.
- Authors are encouraged to suggest names of 3-4 persons who might be considered suitable reviewers of their work.

Title page

The title page must contain the following information:

- Title of the article, the category submitted (article, review, letter), a short title of not more than 40 characters for each page (running head),
- Full name, postal address, e-mail and telephone number of the corresponding author.
- Full name, department, institution, city and country of all co-authors.
- Up to five keywords relevant to the content of your manuscript. This will enable us to identify the most suitable reviewers for your manuscript.

Articles

Articles represent a substantial body of clinical or laboratory work. The paper should be presented in sections as listed below.

Length of manuscript

Abstract: 250 words; Introduction: 500 words, Discussion: 1500; Methods and Results: no limit. If the manuscript exceeds this word count, authors will be required to revise the paper. Permission to exceed these guidelines must be obtained from the Editorial Office.

Abstract

Provide a structured abstract of not more than 150–250 words, using the headings Objectives, Methods, Results and Conclusions.

Introduction

Provide a brief description of the background that led to the study.

Material and methods

Identify details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be clearly explained at the end of this section.

Subheadings that add clarity of presentation are encouraged.

Results

Work should be reported in SI units. Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on validity and significance of results is appropriate but broader discussion of their implication is restricted to the next section.

Subheadings that aid clarity of presentation within this and the previous section are encouraged.

Ethics and consent

When reporting experiments on human subjects, a statement is required that the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. Do not use patients' names, initials, or hospital numbers, especially in illustrative material. Papers including animal experiments or clinical trials must be accompanied by an approval by the local ethics committee and, in the case of animal experiments of any relevant local Licensing Authority. Please give date of issue and registration number in a covering letter. Identifying information should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that the patient be shown the manuscript to be published.

Authors reporting on experimental work on humans should, where relevant, submit evidence that the work has been approved by an institutional clinical research panel or its equivalent.

Discussion

Place the nature and findings of the study in the context of other relevant published data. Avoid undue extrapolation from the study topic.

Acknowledgments

Individuals who have made substantial contributions to the study but who are not included in authorship may be acknowledged. The source of support in the form of grants, equipment and drugs of those involved must be stated.

References

In the text references are given as numbers in brackets on the line in order of appearance. At the end of the paper references are given in accordance with the Vancouver system, cited by the numerical system, and listed in the order cited in the text. List all authors when six or less; when seven or more, list only the first six and add et al. Journal titles are abbreviated in accordance with the style in Index Medicus.

Journals

Belt EA, Kaarela K, Lehto MUK. Destruction and arthroplasties of the metatarsophalangeal joints in seropositive rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1998;27:194-6.

Article published online ahead of the printed version

Laine J, Huovinen E, Virtanen MJ, Snellman M, Lumio J, Ruutu P, et al. An extensive gastroenteritis outbreak after drinking-water contamination by sewage effluent, Finland. *Epidemiol Infect.* Published online: 15 September 2010. doi:10.1017/S0950268810002141.

Article not in English (provide translation)

Ellingsen AE, Wilhelmssen I. Disease anxiety among medical students and law students [in Norwegian]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2002;122:785-7.

Supplements

Emery P. Considerations for nonsteroidal anti-inflammatory drug therapy: benefits. *Scand J Rheumatol* 1996;25 Suppl 105:5-9.

Cochrane

Lipp A, Shaw C, Glavind K. Mechanical devices for urinary incontinence in women. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;12:CD001756.

Books

Maddison PJ, Isenberg DA, Woo P, Glass DN, eds. *Oxford textbook of rheumatology*, Vol. 1. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press, 1993.

Choy EHS, Panayi GS. Therapeutics of the future. In: JJF Belch, RB Zurier, eds. *Connective tissue diseases*. London: Chapman & Hall. 1995:355-77.

URLs

WHO. Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. Norwegian Institute of Public Health (www.whocc.no). Accessed 15 May 2006.

Thesis

Watson EM. Title of PhD thesis. PhD thesis, University of Whatever, 1976.

For references to manuscripts accepted but not published yet, designate the journal and add (in press). Information from manuscripts submitted but not accepted yet should be cited in *the text* as (unpublished observations).

Tables

Tables should be submitted in the same format as your article and embedded in the article. Please note: that ManuscriptCentral CANNOT accept Excel files. If your table(s) are in Excel, copy and paste them into the manuscript file. Each table should be typed on a separate sheet with an appropriate legend and footnotes explaining any abbreviations.

Images

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the main manuscript file.

Each figure of a manuscript should be submitted as a single file.

Tables should NOT be submitted as figures but should be included in the main manuscript file.

Multi-panel figures (those with parts a, b, c, d etc.) should be submitted as a single composite file that contains all parts of the figure.

Black and white images (photographs, line drawings, graphs, pie charts etc.)

All black and white images should be saved and supplied as TIFF, GIF, EPS, PowerPoint or high quality JPEG files to a minimum of 300 dpi.

Colour images should be saved and supplied as TIFF, GIF, or high quality JPEG files to a minimum of 600 dpi. If you choose a higher resolution your image dimension should be reduced accordingly to keep the file under 2MB. SINGLE PAGE Powerpoint files can be submitted. Please submit ONE slide per file ONLY. Alternatively Powerpoint files can be saved as JPEG or TIFF files and submitted as a single image file.

Hard copies may be requested upon acceptance for publication:

Figures will be sized to fit the width of a single or a double column of text, i.e. 80 or 170 mm wide. Any lettering should be in proportion with the overall dimensions of the drawing.

Parts of figures should be labeled with upper case A, B, C etc.

Black and white images

Black and white images (photographs, line drawings, graphs etc.) should be saved and supplied as TIFF, GIF, or high quality JPEG files to a minimum of 300 dpi.

Images should be of sufficiently high quality with respect to detail, contrast and fineness of grain to withstand the inevitable loss of contrast and detail inherent in the printing process.

Colour images

Colour images should be saved and supplied as TIFF, GIF, or high quality JPEG files to a minimum of 600 dpi. Colour illustrations are accepted, but the authors will be required to pay the cost of the reproduction.

Alternatively, if the colour is not critical for the image's scientific understanding, colour can be published online only, as Supplementary data, with a black and white version being published in the print version of the journal.

Please visit <http://cjs.cadmus.com/da/> for instructions on how to prepare digital art.

Legends for illustrations

The legends for illustrations should contain brief but comprehensible explanations.

Any previously published material should be accompanied by the permission of the author and copyright holder for its reproduction.

Online only supplementary material

Additional figures, tables, and text files, etc. may be published online only as supplementary material. The material is subject to the same editorial standards and peer-review procedures as the print publication. If your paper exceeds the word count you should consider if any parts of the article could be published online only. Please note that these files will not be copyedited or typeset and will be published as supplied, therefore PDF files are preferred.

All supplementary files should be uploaded using the File Designation 'Supplementary File'. Please ensure that any supplementary files are cited within the main text of the article.

Brief communications

Short investigative papers, organized in the same manner as full-length articles, but restricted to no more than 1500 words, 3 figures or tables, and up to 15 references.