



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

POLIANA MACEDO GUIMARÃES

**PERFIL DE CITOCINAS TH1, TH17 E TREG EM
LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO:
ASSOCIAÇÃO COM A PRESENÇA
E ATIVIDADE DA DOENÇA**

POLIANA MACEDO GUIMARÃES

**PERFIL DE CITOCINAS TH1, TH17 E TREG EM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO:
ASSOCIAÇÃO COM A PRESENÇA E ATIVIDADE DA
DOENÇA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do Título de MESTRE.

Orientadora: Prof. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Co-orientadora: Prof. Dra. Andréa Name Colado Simão

Londrina
2016

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

Guimarães, Poliana Macedo Guimarães .

Perfil de citocinas Th1 + Th17 e Treg em lúpus eritematoso sistêmico= Associação com a presença e a atividade da doença / Poliana Macedo Guimarães Guimarães. - Londrina, 2016.
113 f. : il.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche Reiche.

Coorientador: Andréa Name Colado Simão Simão .

Coorientador: Karen Brajão de oliveira Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Lúpus eritematoso sistêmico. - Tese. 2. Citocinas. - Tese. 3. Polimorfismo (Genética) - Tese. I. Reiche, Edna Maria Vissoci Reiche. II. Simão , Andréa Name Colado Simão . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

POLIANA MACEDO GUIMARÃES

**PERFIL DE CITOCINAS TH1, TH17 E TREG EM LÚPUS
ERITEMATOSO SISTÊMICO:
ASSOCIAÇÃO COM A PRESENÇA E ATIVIDADE DA DOENÇA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do Título de MESTRE.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Karen Brajão de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Londrina, 25 de Novembro de 2016.

GUIMARÃES, Poliana Macedo. **Perfil de citocinas Th1, Th17 e Treg em lúpus eritematoso sistêmico: associação com a presença e atividade da doença.** 2016. 118 páginas. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Introdução: O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune complexa na qual ocorre a perda de tolerância a antígenos próprios, caracterizada por processo inflamatório sistêmico e crônico e pela produção excessiva de citocinas inflamatórias e altos títulos de autoanticorpos. Atualmente, existe um grande interesse clínico na identificação de biomarcadores que estejam intimamente associados à atividade da doença. Nesse sentido, assume destaque um grande número de citocinas que contribuem para a resposta imune no LES. Evidências sugerem que, além de citocinas produzidas pelas células Th1, como interferon gama (IFN- γ), interleucina (IL)-12 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as citocinas produzidas pelas células Th2, como IL-4 e IL-6, também as citocinas IL-17 e IL-10, produzidas pelas células Th17 e T reguladoras (Treg), respectivamente, estão envolvidas no desequilíbrio imunológico. Além disso, o polimorfismo genético *NcoI* do *TNF β* (rs909253), fatores ambientais e alterações dos níveis séricos da vitamina D e cortisol estão envolvidos na modulação das citocinas, contribuindo para aumentar o estado inflamatório e podendo estar associados à atividade da doença.

Objetivo: Delinear os perfis de citocinas associados com LES para a construção de modelos de previsão da presença e atividade da doença, bem como avaliar se o polimorfismo *NcoI* do *TNF β* , o índice de massa corporal (IMC) e os níveis séricos de vitamina D e cortisol estão associados aos níveis de citocinas no LES.

Sujeitos e Métodos: Participaram deste estudo 200 pacientes com LES e 196 controles saudáveis. O LES foi diagnosticado utilizando os critérios revisados do *American College of Rheumatology*, 2013, e a atividade da doença foi determinada utilizando pontuação *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI). Os níveis plasmáticos das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-17 foram determinados pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) de sanduíche. Os perfis de citocinas foram estabelecidos como pró-inflamatório (IL-1+IL-6+TNF- α), Th1 (IL-12+IFN- γ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-6+IL-17) ou Treg (IL-10). Os níveis séricos de vitamina D foram determinados pelos níveis de 25-hidroxitamina D[25(OH)D] utilizando imunensaio quimioluminescente de micropartículas (CMIA), assim como os níveis séricos basais de cortisol. Os níveis séricos de proteína C reativa ultrasensível (usPCR) foram determinados pelo método de CMIA. Os títulos de autoanticorpos contra antígenos nucleares (ANA) foram avaliados por imunofluorescência indireta e anticorpos contra DNA de dupla cadeia (anti-dsDNA) por ELISA. Os genótipos B1/B1, B1/B2 e B2/B2 do polimorfismo *NcoI* do *TNF β* foram determinados pela reação em cadeia da polimerase, seguida pela análise do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição.

Resultados: Os pacientes diferiram dos controles quanto ao sexo, idade e IMC, sendo mais frequentes no sexo feminino [187 mulheres (F) para 13 homens (M) vs. 151 (F) para 43 (M), $p < 0,001$, com razão F:M de 14,4:1 e 3,5:1, respectivamente]. Os pacientes foram mais idosos que os controles (41,2 anos \pm 13,3 vs. 36,5 \pm 11,3, $p < 0,001$), assim como apresentaram maior IMC (27,6 kg/m² \pm 5,8 vs. 25,1 \pm 4,5, $p < 0,001$). Quando comparados aos controles, os pacientes apresentaram níveis mais elevados de usPCR e menores de cortisol ($p = 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente). Os níveis de 25(OH)D não diferiram entre os grupos ($p = 0,229$), mas foram inversamente associados aos níveis de IFN- γ ($p = 0,004$). Não foi encontrada

associação significativa entre os níveis de cortisol e os de citocinas ($p=0,084$). Não houve associação significativa entre o polimorfismo *Ncol* do *TNF β* e a presença de LES ($p=0,226$); no entanto, a análise multivariada demonstrou associações significativas entre os níveis de citocinas e ambos os genótipos B1/B1 ($p=0,018$) e B1/B2 ($p=0,014$). Os testes de efeitos entre os grupos demonstraram que o genótipo B1/B2 foi associado ao aumento de IL-4 ($p=0,046$) e TNF- α ($p=0,008$), enquanto o genótipo B1/B1 foi associado ao aumento de IL-17 ($p=0,001$). Quando os medicamentos utilizados no tratamento dos pacientes com LES foram introduzidos como variável explicativa adicional na análise multivariada, não se observou alteração significativa dos resultados ($p>0,05$). O resultado da análise multivariada mostrou que todos os perfis de citocinas foram significativamente mais elevados no grupo com LES do que no grupo controle ($p<0,001$), exceto o perfil pró-inflamatório (IL-1+IL-6+TNF- α) que mostrou uma tendência a ser diminuído nos pacientes com LES ($p=0,076$). A maior diferença significativa foi encontrada para o perfil Th1+Th17/Th2 no grupo de pacientes e controles. Verificou-se um efeito significativo na multivariada para o polimorfismo *Ncol* do *TNF- β* nos perfis de citocinas ($p=0,003$). Após avaliar os efeitos da multivariada para os genótipos sobre os oito perfis de citocinas, verificou-se um efeito positivo para o genótipo B1/B1 somente sobre os perfis Th17 (IL-6+IL-17, $p=0,007$) e para o perfil Th17/Th2 (IL6+IL17/IL4, $p=0,002$). Os perfis Th1+Th17 (IL-12+IFN- γ + IL-6+IL-17), assim como a Treg (IL-10), ambos associados positivamente com LES ($p<0,001$ e $p=0,001$, respectivamente) e Th2 (IL-4), associada negativamente ($p=<0,001$) foram preditores de LES, ou seja, 90,4% de todos os indivíduos foram corretamente classificados com a presença da doença, com sensibilidade de 66,7% e especificidade de 96,9%. O SLEDAI foi predito pela razão Th1+Th17/Th2, Treg, IMC (todos positivamente, $p<0,05$) e perfil pró-inflamatório (negativamente, $p=0,034$).

Conclusão: O perfil de citocinas Th1 + Th17 e Treg (IL-10), juntamente com a diminuição da produção de IL-4 foram associados à presença de LES, bem como com o SLEDAI, ANA, anti-dsDNA e IMC. Sugere-se que este perfil de citocinas pode ser um candidato para a identificação de novos alvos terapêuticos, assim como um possível biomarcador da atividade da doença.

Palavras-chave: Lupus eritematoso sistêmico. Citocinas. Polimorfismo genético. *TNF β* . Cortisol. Vitamina D. SLEDAI.

GUIMARÃES, Poliana Macedo. **Profile of cytokines Th1, Th17 and Treg in systemic lupus erythematosus: association with the presence and disease activity.** 2016. 118 pages. Dissertation (Master in Health Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Introduction: Systemic lupus erythematosus (SLE) is a complex autoimmune disease, in which occurs loss of self antigens tolerance, characterized by a systemic and chronic inflammatory process, an excessive production of inflammatory cytokines and high titers of autoantibodies. Currently, there is great clinical interest in the identification of biomarkers that are closely associated with disease activity. In this sense, a large number of cytokines can modulate the immune response in SLE patients. Evidences suggest that in addition to cytokines produced by Th1 cells, such as interferon gamma (IFN- γ), interleukin (IL)-12 and tumor necrosis factor (TNF- α), and cytokines produced by Th2 cells, such IL-4 and IL-6, also IL-17 and IL-10 cytokines, produced by Th17 cells and T regulatory (Treg), respectively, are involved in immune imbalance observed in the disease. In addition, the *TNF β NcoI* (rs909253) genetic polymorphism, environmental factors, changes in serum vitamin D and cortisol levels are involved in the modulation of cytokines and contribute to an increased inflammatory status and may be associated with disease activity.

Objective: To delineate cytokine profiles associated with SLE for the construction of predictive models of presence and activity of SLE, as well as to examine whether *TNF β NcoI* polymorphism, body mass index (BMI), vitamin D and cortisol influence cytokine levels in SLE.

Subjects and Methods: In this study 200 SLE patients and 196 healthy controls were involved participated in this study. SLE was diagnosed using the revised criteria of the American College of Rheumatology, 2013, and the disease activity was determined using Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) criteria. Plasma levels of the TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 and IL-17 cytokines were determined by the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Cytokine profiles were established as pro-inflammatory (IL-1+IL-6+TNF- α), Th1 (IL-12+IFN- γ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-6+IL-17) or Treg (IL-10). Serum levels of vitamin D were determined by the levels of 25-hydroxivitamin D [25(OH)D] using chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA), as well as the baseline serum levels of cortisol. High sensitivity C-reactive proetina (hsCRP) was determined using CMIA. Antinuclear antibodies (ANA) were quantified using indirect immunofluorescence and anti-dsDNA antibodies were quantified using (ELISA). The B1/B1, B1/B2 and B2/B2 genotypes of the *TNF β NcoI* polymorphism were determined usign polymerase chain reaction and restriction length fragment polymorphism.

Results: Patients differed from controls for sex, age and BMI. Patients were more frequent among females [187 females (F) for 13 males (M) vs. 151 (F) to 43 (M), $p < 0.001$, with F: M ratio of 14.4: 1 and 3.5: 1, respectively]. Patients were older (41.2 years \pm 13.3 vs. 36.5 \pm 11.3, $p < 0.001$), as well as showed higher BMI than controls (27.6 kg/ m² \pm 5.8 vs. 25 , 1 \pm 4.5, $p < 0.001$). When compared to controls, patients had higher hsCRP and lower cortisol levels ($p=0.001$ and $p < 0.001$, respectively). The levels of 25(OH)D did not differ between the groups ($p=0.229$), but were inversely associated with IFN- γ levels ($p=0.004$). There was no significant association between cortisol and cytokine levels ($p=0.084$). There was no significant association between the *TNF β NcoI* polymorphism and the presence of SLE ($p=0.226$); however, the multivariate analysis demonstrated a significant association between cytokine levels and B1/B1 and B1/B2 genotypes ($p=0.018$ and $p=0.014$, respectively). Effects

tests between groups showed that the B1/B2 genotype was associated with increased IL-4 ($p=0.046$) and TNF- α ($p=0.008$), whereas B1/B1 genotype was associated with increased IL-17 ($p=0.001$). When the drugs used to treat SLE patients were introduced as an additional explanatory variable in the multivariate analysis, there was no significant alteration of the results ($p > 0.05$). The results of the multivariate analysis showed that all cytokine profiles were significantly higher in SLE than in the control group ($p < 0.001$), except the proinflammatory profile (IL-1+IL-6+TNF- α), which showed a trend toward to be decreased in SLE patients ($p=0.076$). The highest significant difference was found for the Th1+Th17/Th2 profile, for SLE patients and controls. There was a significant multivariate effect for *TNF β Ncol* polymorphism in cytokine profiles ($p=0.003$). After evaluating the effects of the multivariate for genotypes of eight cytokine profiles, there was a positive effect on the B1/B1 genotype only on the Th17 (IL-6+IL-17, $p=0.007$) and Th17/Th2 (IL6+IL17/IL4, $p=0.002$) profiles. The Th1+Th17 profile (IL-12+IFN- γ +IL-6+IL-17), as well as IL-10, both positively associated with SLE ($p < 0.001$ and $p=0.001$, respectively) and IL-4 negatively associated ($p < 0.001$) were predictors of SLE, and 90.4% of all individuals were correctly classified as having the disease, with 66.7% of sensitivity and 96.9% of specificity. The SLEDAI was predicted by the ratio between Th1+Th17/Th2, as well as IL-10 and BMI (all positively, $p < 0.05$) and proinflammatory profile (negatively, $p=0.034$).

Conclusion: The Th1 + Th17 and Treg (IL-10) cytokine profile, together with decreased IL-4 were associated with SLE presence, as well as with SLEDAI, ANA, anti-dsDNA and BMI. It is suggested that such a cytokine profile may be a candidate for new therapeutic targets as well as a possible biomarker of disease activity.

Keywords: Systemic lupus erythematosus. Cytokine. *TNF β Ncol* polymorphism. Cortisol. Vitamin D. SLEDAI.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 -	A patogênese do lúpus eritematoso sistêmico (LES). Fonte: Mok, Lau (2003) adaptada.....	27
Figura 2 -	O papel de alguns alelos de risco na patogênese do LES. Fonte: Liu e Davidson (2013) adaptada.....	28
Figura 3 -	Representação esquemática da diferenciação de células TCD4+ naïve. Com destaque para as citocinas indutoras da diferenciação das células Th1, Th2, Th17 e Treg e as principais citocinas secretadas. Fonte: LOHOFF (2009) adaptada.....	35
Tabela 1 -	Prevalência e incidência do lúpus eritematoso sistêmico (LES), estimada por 100.000 habitantes, obtidas em diferentes populações mundiais	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

25(OH)D	25-hydroxyvitamin-D (25-hidroxivitamina-D)
ACR	American College of Rheumatology (Colégio Americano de Reumatologia)
ANA	Antinuclear antibodies (anticorpos antinucleares)
Anti-dsDNA	Anti-double-stranded DNA antibody (anticorpos anti-DNA de cadeia dupla)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Antigen-presenting cell (células apresentadoras de antígeno)
BMI	Body mass index (índice de massa corporal)
C3	Complement component 3 (componente do complemento C3)
C4	Complement component 4 (componente do complemento C4)
CA	Circunferência abdominal
CRP	C-reactive protein (proteína C-reativa)
CVD	Cardiovascular disease (doença cardiovascular)
DCV	Doença cardiovascular
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etileno diamino tetraacético)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio de imunoabsorção enzimática)
FDA	Food and drug administration
GLM	Multivariate general linear model (modelo de multivariada linear geral)
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)
HLA	Human leukocyte antigen (antígeno leucocitário humano)
IBD	Inflammatory bowel disease (doença inflamatória do intestino)
IFI	Indirect immunofluorescence (imunofluorescência indireta)
IFN	Interferon (interferon)
IgE	Immunoglobulin E (imunoglobulina E)
IL	Interleukin (interleucina)
IMC	Índice de massa corpórea

LES	Lúpus eritematoso sistêmico
NF-kB	Factor nuclear kappa B (fator nuclear kappa B)
NK	Natural killer cell (célula exterminadora natural)
NL	Nefrite lúpica
NO	Nitric oxide (óxido nítrico)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Proteína C reativa
PGE2	Prostaglandin E2 (prostaglandina E2)
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição)
RNA	Ribonucleic acid (ácido ribonucléico)
SLE	Systemic lupus erythematosus (lúpus eritematoso sistêmico)
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (índice de atividade do lúpus eritematoso sistêmico)
Th	T helper lymphocytes (linfócitos T auxiliares)
TLR	Toll-like receptors (receptores do tipo Toll)
TNF	Tumor necrosis factor (fator de necrose tumoral)
TNF α	NcoI Tumor necrosis factor beta NcoI polymorphism (Polimorfismo NcoI do fator de necrose tumoral beta)
Tregs	Regulatory T cells (Células T reguladoras)
UV	Ultraviolet radiation (radiação ultravioleta)
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. EPIDEMIOLOGIA DO LES	19
1.2. ETIOLOGIA DO LES	21
1.3. FISIOPATOLOGIA DO LES	24
1.4. DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DO LES.....	30
1.5. TRATAMENTO DO LES	32
1.6. LES E CITOCINAS	32
1.6.1. INTERLEUCINA 4 (IL-4)	36
1.6.2. INTERLEUCINA 6 (IL-6)	36
1.6.3. INTERLEUCINA 10 (IL-10)	37
1.6.4. INTERLEUCINA 17 (IL-17)	39
1.6.5. INTERLEUCINA 12 (IL-12) E INTERFERON (IFN)	41
1.7. IMUNOMODULAÇÃO DAS CITOCINAS E LES.....	43
1.7.1. Polimorfismo <i>Ncol</i> do <i>TNFβ</i> , citocinas e LES.....	43
1.7.2. Vitamina D [1,25(OH)D], citocinas e LES	45
1.7.3. Cortisol, citocinas e LES.....	46
1.7.4. Proteína C reativa (PCR), citocinas e LES.....	46
1.7.5. Índice de Massa Corpórea (IMC), SLEDAI, anti-dsDNA e LES	47
2. JUSTIFICATIVA.....	48
3. OBJETIVOS	49
3.1. OBJETIVO GERAL	49
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1. POPULAÇÃO, AMOSTRA E DELINEAMENTO.....	50
4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	50
4.3. ASPECTOS ÉTICOS, CONSENTIMENTO, SAÚDE E SEGURANÇA	50
4.4. DADOS DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS E MENSURAÇÕES DE PRESSÃO SANGUÍNEA	51
4.5. MARCADORES LABORATORIAIS	51
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5. RESULTADOS.....	54
5.1. TRABALHO DESENVOLVIDO	54
6. CONCLUSÃO	87
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
REFERÊNCIAS.....	90
ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO CEP/UDEL.....	108
ANEXO 2 - Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index - SLEDAI	111

APÊNDICE 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para grupo de pacientes)	113
APÊNDICE 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para grupo controle).....	115
APÊNDICE 3 - Questionário Controles	117
APÊNDICE 4 - Ficha de avaliação pacientes - Projeto LES.....	118

1. INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune complexa em que ocorre a perda de tolerância a antígenos próprios, caracterizada por processo inflamatório sistêmico e crônico, produção excessiva de citocinas inflamatórias e altos títulos de autoanticorpos dirigidos, especialmente, contra antígenos nucleares, citoplasmáticos e de superfície celular (LISNEVSKAIA et al., 2014; TSOKOS, 2011; OATES, 2010). Embora possa ocorrer em ambos os sexos e em qualquer faixa etária, 80 a 90% dos casos acometem mulheres em idade reprodutiva (LIM et al., 2014).

Os autoanticorpos direcionados contra estruturas do núcleo foram denominados anticorpos antinucleares (ANA) e anticorpos contra antígenos extraíveis de núcleo (anti-ENAs). Como exemplo mais conhecido de ANA está o autoanticorpo contra o DNA de dupla fita (anti-dsDNA) ou DNA nativo. Dentre as pequenas proteínas de ligação reconhecidas pelos anti-ENAs, estão os anti-Smith (anti-Sm, Smith em virtude do nome do primeiro paciente em que o anticorpo foi reconhecido), anti-SSA/Ro (anti-Ro, contra o antígeno Ro, uma proteína citoplasmática pequena ligada ao RNA), anti-SSB/La (anti-La, contra partículas protéicas do RNA e parecem participar como um cofator para a RNA polimerase), anti-snRNP (anti-RNP, contra partículas nucleares pequenas de ribonucleoproteínas), entre outros (OATES, 2010).

Yaniv e colaboradores (2015), adequadamente, empregaram o termo “explosão vulcânica” para designar os mais de 180 autoanticorpos identificados em pacientes com LES e, atualmente, passou a ser a doença autoimune com o maior número de autoanticorpos conhecidos e detectáveis (YANIV et al., 2015). Estes inúmeros autoanticorpos produzidos tendem a se ligar com antígenos nucleares e/ou citoplasmáticos liberados pela lesão celular, originando imunocomplexos autorreativos circulantes e/ou de deposição, responsáveis por muitas manifestações clínicas observadas nos pacientes com LES (TSOKOS, 2011).

As manifestações clínicas do LES podem oscilar entre leve a grave, alternando entre períodos de atividade (*flares*) e assintomáticos, de curso imprevisível. Durante os períodos de atividade, podem estar presentes as clássicas lesões de pele, febre, sintomas músculo-esqueléticos, atralgia, fadiga, entre outros. No entanto, os sintomas podem agravar-se para o risco de morte pelo envolvimento de órgãos vitais, como coração, rins, fígado e cérebro (MAK et al., 2012). Os pacientes com LES têm duas a cinco vezes

maior risco de morte em comparação com a população em geral (NIEVES et al., 2016). A mortalidade pode ser atribuída a inúmeros fatores, tais como agressividade autoimune, doença cardiovascular (DCV), infecções, danos renais, neuropsiquiátricos e câncer. Entretanto, de acordo com a metanálise de Mak et al. (2012), os danos renais e neuropsiquiátricos são expressivos e preocupantes entre pesquisadores em todo o mundo.

Existe uma variedade de hipóteses que norteia os mecanismos imunes para a perda da tolerância a antígenos próprios e a produção dos autoanticorpos no LES (OATES, 2010). O conhecimento sobre o papel dos autoanticorpos no início da doença já foi bem caracterizado (LISNEVSKAIA et al., 2014; TSOKOS, 2011). No presente estudo, assumem destaque o papel das alterações das citocinas, capazes de dirigir as respostas imunes no LES (LU et al., 2016; GUO et al., 2015; KOENIG et al., 2012).

As citocinas são fatores solúveis que desempenham papel fundamental na diferenciação, maturação e ativação das células imunes (MCCARTHY et al., 2014). Pesquisas demonstram que as citocinas estão envolvidas nas manifestações clínicas e na atividade do LES (TALAAT et al., 2015; POSTAL et al., 2013; KOENIG et al., 2012). Os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias são responsáveis por conduzir a uma exacerbação da resposta inflamatória, apoptose e contribuir para a produção de autoanticorpos que iniciam e sustentam a atividade do LES (POSTAL et al., 2013; YAP et al., 2010). As citocinas estão agrupadas em perfis, com base nos seus efeitos funcionais, tais como citocinas produzidas por células T auxiliares (do inglês, *T helper* ou Th)1, Th2, Th17 e por células T reguladoras (Tregs). Em geral, aceitava-se que a participação predominante de uma resposta única Th2 ou que as respostas Th1 e Th2 concomitantes seriam responsáveis por dirigir a autoimunidade no LES (DOLFF et al., 2011; MIYAKE et al., 2011; THEOFILOPOULOS et al., 2001). No entanto, evidências posteriores sugerem que, além das citocinas Th1, tais como o interferon (IFN)- γ , interleucina (IL)-2, fator de necrose tumoral (TNF)- α e as citocinas Th2, tais como IL-4, IL-5 e IL-6, também as respostas Th17 (IL-17) e Treg (IL-10) estão envolvidas no desequilíbrio imune responsável por manifestações clínicas e atividade da doença (LU et al., 2016; TALAAT et al., 2015; KOENIG et al., 2012; DOLFF et al., 2011). Além disso, o polimorfismo genético *NcoI* do *TNF β* (rs909253), assim como alterações nos níveis de vitamina D e cortisol, poderiam estar envolvidos na modulação das citocinas e contribuir para aumentar o estado inflamatório da doença (YAP et al., 2015; ABOU-RAYA et al., 2013).

Existe um grande interesse clínico na identificação de biomarcadores que estejam intimamente associados com o LES e a sua atividade. O conhecimento sobre as

citocinas não apenas promove a compreensão da fisiopatologia do LES, mas também fornece percepções para a avaliação de possíveis biomarcadores que possam prever a presença da doença e auxiliar no monitoramento da atividade do LES, além de oferecer opções para novos alvos terapêuticos direcionados e inovadores, ainda insuficientes no arsenal terapêutico para pacientes com LES.

1.1. EPIDEMIOLOGIA DO LES

A prevalência do LES, em média, é de 9 mulheres para cada homem e ocorre, predominantemente, entre a faixa etária de 20 a 40 anos de idade, apontando para um forte viés de gênero e período reprodutivo (LIM et al., 2014). Antes da puberdade e após a menopausa, esta razão é menor, cerca de 2-6:1 e 3-8:1, respectivamente. No entanto, a doença pode afetar ambos os sexos, bem como indivíduos de todas as idades e grupos étnicos (TEDESCHI et al., 2013).

Estudos epidemiológicos associam uma maior frequência de LES em indivíduos não-caucasianos, membros de grupos minoritários étnicos e de baixa renda, cuja origem hispânica, asiática ou negra revela as maiores taxas de incidência e prevalência da doença (HANLY et al., 2016; REES et al., 2014; FESSEL et al., 1974). Particularmente em pessoas negras, foi observado um aumento de três a quatro vezes na ocorrência de LES, quando comparados aos caucasianos (LIM et al., 2014).

Os dados disponíveis sobre a incidência e prevalência de LES, no mundo, não estão completamente descritos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a prevalência do LES na população em geral é de 40-50 casos a cada 100.000 pessoas, e a taxa de incidência é de 2-8 novos casos por ano, a cada 100.000 pessoas (WHO, 2006). De acordo com estudos epidemiológicos nos últimos 20 anos, as taxas de prevalência para o LES em diversos países da Europa (INGVARSSON et al., 2016; REES et al., 2016; ARNAUD et al., 2014; NASONOV et al., 2014), América do Norte (HOUSEY et al., 2015; LIM et al., 2014; SOMERS et al., 2014), América Latina (SCOLNIK et al., 2014; NAKASHIMA et al., 2011; VILAR, SATO, 2002), países da Região Pacífico-Ásia (YU et al., 2013; JAKES et al., 2012), entre outros países, variam de 9,0 a 97,4/100.000 e incidência de 0,3 a 8,7/100.000 pessoas/ano. Quatorze estudos relevantes que investigaram a epidemiologia no LES foram identificados em uma busca no banco de dados PubMed e estão resumidos na Tabela 1. Neste levantamento bibliográfico, a maior taxa de incidência de LES foi de 8,7/100.000 pessoas/ano relatada no Brasil, na cidade de Natal, Rio Grande

do Norte, onde se observou uma taxa de incidência muito acima da maioria dos dados internacionais publicados (VILAR; SATO, 2002).

Em grande parte do continente africano e outros países em desenvolvimento, as taxas de incidência/prevalência do LES ainda são indeterminadas ou inexistentes. Existe a hipótese que a baixa incidência entre os africanos deve-se à presença endêmica de malária, que poderia ter alterado a resposta imune e forneceu mecanismos peculiares de autoproteção (BAE et al., 1998). No entanto, outros autores defendem que a aparente raridade de casos nessas regiões pode ser resultado de uma combinação de escassez de dados e subdiagnóstico da doença. Grande parte dessa população é constituída por indivíduos não-caucasianos que vivem nas regiões mais quentes dos hemisférios, sob precárias condições socioeconômicas e serviços de saúde deficientes, nas quais as taxas de prevalência, espectro, comorbidades e gravidade do LES podem variar muito (AROUND et al., 2014; TIFFIN et al., 2014).

Tabela 1 - Prevalência e incidência do lúpus eritematoso sistêmico (LES), estimada por 100.000 habitantes, obtidas em diferentes populações mundiais.

Local do estudo	Período	Prevalência	Incidência	Referência
Rússia	2010	9,0 (7,1–11,2)	1,4 (0,7–2,4)	NASONOV et al.(2014)
Cazaquistão	2010	20,6 (15,4–27,0)	1,6 (0,4–4,1)	NASONOV et al. (2014)
Ucrânia	2010	14,9 (10,9–19,9)	0,3 (0,0–1,8)	NASONOV et al. (2014)
Reino Unido	1999-2012.	97,04 (94,18-99,90)	4,91 (4,73-5,09)	REES et al. (2016)
França	2010	47,0 (28,57-133,09)	3,32 (1,90-9,71)	ARNAUD et al. (2014)
Suécia	1981-2006	(55-65)	3,9 (2,1-5,5)	INGVARSSON et al. (2016)
Taiwan	2000-2008	37,0 (10,0-41,0)	8,4	YU et al. (2013)
Região Pacífica da Ásia*	1959 - 2007	(4,3–45,3)	(0,9–3,1)	JAKES et al. (2012)
EUA	2002-2004	72,8 (70,8-74,8)	5,5 (5,0-6,1)	SOMERS et al. (2014)
EUA	2002-2004	74,4 (70,3-78,9)	5,6 (5,0-6,3)	LIM et al. (2014)
EUA	2002-2005	62,6 (51,9, 73,3)	7,6 (4,1, 11,2)	HOUSEY et al. (2015)
Argentina	1998-2009	58,6 (46,1-73,5)	6,3 (4,9-7,7)	SCOLNIK et al. (2014)
Brasil	2000	N/A	8,7 (6,3-11,7)	VILAR; SATO (2002)
Brasil	2007-2008	N/A	4,8	NAKASHIMA et al. (2011)

*China, Coreia, Japão, Taiwan, Hong Kong, Vietnã, Filipinas, Tailândia, Malásia, Singapura, Indonésia, Austrália e Nova Zelândia); EUA: Estados Unidos da América; N/A: Não avaliado; Valores em parênteses são estimados para o intervalo de confiança de 95%.

1.2. ETIOLOGIA DO LES

Os mecanismos celulares e moleculares etiológicos precisos que conduzem para o desenvolvimento do LES ainda não estão completamente estabelecidos. No entanto, estudos mostram que a etiologia do LES é multifatorial e envolve uma grande diversidade de fatores genéticos, ambientais, hormonais e imunológicos (TSOKOS, 2011).

Entre os fatores genéticos, diversos genes e polimorfismos genéticos estão envolvidos na fisiopatologia do LES (GHODKE-PURANIK et al., 2015). Estudos em famílias, especialmente investigações sobre gêmeos monozigóticos e dizigóticos, indicam um papel essencial para a predisposição genética para LES (RAMOS et al., 2010). Trabalhos de associação genômica listam mais de 50 genes que predisõem ao LES (CRISPÍN et al., 2013; DENG et al., 2010; FLESHER et al., 2010). Os casos de LES comumente resultam de um efeito cumulativo de um grande número de genes e raramente da deficiência de um único gene (TSOKOS, 2011). De acordo com Mohan et al. (2015), os genes identificados que estão em associação com LES possuem algumas categorias funcionais, como por exemplo: 1) os genes envolvidos com a sinalização da resposta imune inata, especialmente a sinalização do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) e IFN- α ; 2) os genes associados a ativação de linfócitos; 3) os genes associados aos danos no tecido renal e ainda, 4) os genes que influenciam a eliminação de detritos apoptóticos, cromatina, complexos imunes, entre outros. A região genômica que codifica as moléculas do antígeno leucocitário humano (HLA) é um dos fatores genéticos importantes envolvidos na etiologia do LES. A presença de alelos *HLA-DR2* e *HLA-DR3* representam um risco relativo de cerca de duas a cinco vezes para o desenvolvimento da doença (PISETSKY, 2015). Os genes *HLA* de classe II também têm sido associados com a presença de autoanticorpos anti-Sm, anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-RNP e anti-dsDNA no LES (SCHUR, 1995).

O TNF- α é uma citocina crucial na patogênese de diversas doenças inflamatórias, incluindo o LES (SANTOS et al., 2012). Os níveis de TNF- α são mais elevados no LES ativo e se correlacionam com o processo inflamatório e a atividade da doença (FARID et al., 2011). No contexto da regulação da expressão de TNF- α , evidências mostram que o polimorfismo *NcoI* do gene *TNF β* está relacionado com a ativação do promotor do TNF- α , conduzindo ao aumento da produção de TNF- α e contribuindo para a etiologia, evolução e prognóstico do LES. Estudos ainda

demonstraram que o genótipo B2/B2 deste polimorfismo está relacionado com o aumento tendencioso para o desenvolvimento da nefrite lúpica (NL) (KALLAUR et al., 2010, 2014; ZHANG et al., 1997; KIM et al., 1995; MOON et al., 1995; BETTINOTTI et al., 1993).

Um gatilho causado por fatores ambientais em indivíduos geneticamente predispostos pode desencadear mecanismos para o desenvolvimento das doenças autoimunes e ativam vias celulares associadas à doença ou alterações fisiológicas que evoluem para as doenças autoimunes (WAHREN-HERLENIUS et al., 2016). A luz solar e radiação ultravioleta (UV) são importantes gatilhos ambientais envolvidos na manifestação do LES. A radiação UV, especialmente do tipo B (UVB) (290-320nm), desempenha um papel importante na produção de citocinas e pode induzir fotossensibilidade e agravamento dos sintomas sistêmicos do LES. Cerca de 60% dos pacientes com LES já desenvolveram lesões de pele após exposição à radiação UV (ROBINSON; WERTH, 2015). A luz UV pode induzir a apoptose e necrose dos queratinócitos, aumento de expressão de autoantígenos, acúmulo de células apoptóticas e células dendríticas na pele com liberação de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas como IL-6, IL-17, TNF- α , IL-1, além de quimiocinas e autoantígenos. Estas citocinas, particularmente IL-1 e TNF- α , provocam um estímulo adicional para produção de outras citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (DENG et al., 2015; KUHN et al., 2014; REEFMAN et al., 2008). Regiões tropicais ou subtropicais mais quentes também contribuem com distintos níveis de exposição à luz solar, acentuando as diferenças no aumento dos casos de LES entre os países (TIKLY et al., 2008).

O tabagismo é um fator ambiental capaz de aumentar o risco de LES. Uma meta-análise publicada em 2015 demonstrou uma *odds ratio* (OR) de 1,56 vezes para o risco de LES entre os fumantes, em comparação com não fumantes (JIANG et al., 2015). Fumar não somente piora a gravidade da doença, como também diminui a eficácia do tratamento com antimaláricos (CHASSET et al., 2015). O cigarro contém inúmeras substâncias químicas tóxicas que podem causar mutações genéticas e prejudiciais à resposta imune humoral e mediada por células. Fumar predispõe ao aumento da concentração de radicais livres, ativação irregular de macrófagos e células dendríticas, elevação de imunoglobulina E (IgE) responsável por sintomas de doenças atópicas, intensificação da produção de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e a proteína de fase aguda positiva proteína C reativa (PCR). Somam-se a esses, os defeitos

apoptóticos, como depuração diminuída de detritos celulares e anormalidades na função de células T e células *natural killers* (NK) (ARNSON et al., 2010).

O índice massa corporal (IMC) também pode ser considerado um fator associado ao LES, com maior pontuação no *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) e relacionado com o aumento do estado inflamatório e estresse oxidativo nos pacientes com LES (LOZOVOY et al., 2011). Outros fatores ambientais envolvidos são as infecções virais e a exposição à substâncias químicas, assim como os fatores emocionais também contribuem para o desencadeamento da doença (LIMA et al., 2015).

Quanto aos fatores hormonais, o desequilíbrio hormonal pode modular a incidência e gravidade do LES. O cortisol é conhecido por ter uma importante ação imunomoduladora (GUTIÉRREZ et al., 1998). Evidências sugerem que a forma ativa da vitamina D - 1, 25 hidroxivitamina-D [1, 25(OH)D] - é um hormônio com importante efeito regulador sobre o desequilíbrio imunológico associado ao LES (YAP et al., 2015). As quantidades insuficientes de 1,25(OH)D disponíveis em alimentos, aliadas à falta de exposição solar, predispõem a deficiência desse hormônio e, assim, aceleram os efeitos danosos adversos sobre muitos tecidos e órgãos em pacientes com LES (KOKIC et al., 2015; MULLER, 1995). O hormônio sexual estradiol também possui efeitos imunomoduladores na progressão do LES. Variações fisiológicas, terapêuticas e diversas condições hormonais patológicas, por exemplo, ciclo menstrual, estresse crônico, uso de corticosteróides, contraceptivos orais e de reposição esteróide, podem alterar o nível de estrogênio sistêmico e desempenhar um importante papel na etiologia do LES (KOKIC et al., 2015; GRIMALDI, 2006). A prolactina, também, foi recentemente associada ao desencadeamento da resposta autoimune que caracteriza o LES (COSTANZA et al., 2015; JEGANATHAN et al., 2014).

1.3. FISIOPATOLOGIA DO LES

A fisiopatologia do LES é complexa e desafiadora. Os mecanismos fisiopatológicos, em geral, compreendem a produção de anticorpos autorreativos, predominantemente, contra antígenos nucleares (como anti-dsDNA, anti-Sm, anti-RNP, anti-SSA/Ro, anti-SSB/La), deposição de imunocomplexos, deficiência na remoção de imunocomplexos, ativação do sistema complemento, falha na tolerância central e periférica dos linfócitos B e T, produção de citocinas inflamatórias e outros processos

inflamatórios que resultam em inflamação crônica e lesão celular e/ou tissular (LISNEVSKAIA et al., 2014; TSOKOS, 2011) (Figura 1).

Tanto a imunidade inata, quanto a imunidade adaptativa contribuem para o desenvolvimento do LES. O sistema imune inato contribui nas fases iniciais da doença pela participação de fatores da via clássica do sistema complemento (proteínas C1q, C2 e C4) e de receptores do tipo *toll* (TLR). Os complexos imunes formados inicialmente ativam o TNF- α em células dendríticas mielóides e IFN- α em células dendríticas plasmocitóides, estimulando linfócitos T a produzirem mediadores inflamatórios autoimunes (ARINGER et al., 2013). No sistema imune adaptativo, a resposta imune humoral resultante da atividade clássica de células CD4⁺ Th2 leva a ativação de linfócitos B e produção de anticorpos e citocinas anormalmente aumentadas e desreguladas. Já as células T conduzem a ativação de células B por meio de mediadores inflamatórios (MOHAN e al., 2015) (Figura 2). No entanto, a tendência atual é desviar-se da tradicional linha de pensamento e entender como o LES compartilha mecanismos imunológicos subjacentes, com interações entre a resposta Th1, Th2 e Th17, juntamente com a produção excessiva de citocinas proinflamatórias (TEDESCHI et al., 2013).

Entre os autoanticorpos, o anti-dsDNA foi amplamente utilizado para classificar e diagnosticar LES (HIETARINTA; LASSILA, 1996). Os anticorpos anti-dsDNA são espontaneamente produzidos no LES, de forma transitória ou persistente, fortemente influenciados pela natureza dos antígenos indutores. A sua presença foi associada com atividade da doença e a danos específicos de órgãos no paciente com LES. O seu mecanismo de ação se dá pela formação e deposição de imunocomplexos, com lise celular direta, opsonização e fixação de complemento (REKVIG, 2015). Os mecanismos pelos quais os demais autoanticorpos exercem a sua ação patogênica também são complexos e variáveis. Os autoanticorpos anti-Sm, anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-snRNP, antilinfócito, antieritrócito, antifosfolipídicos, entre outros menos expressivos, ligam-se à superfície da célula, conduzindo citólise e citotoxicidade (YANIV et al., 2015; OATES, 2010;).

No LES, os autoantígenos comumente contêm ácidos nucléicos e podem funcionar como miméticos de vírus. Os complexos formados por autoanticorpos, proteínas e ácidos nucléicos são facilmente confundidos com partículas virais opsonizadas, de forma que podem ser reconhecidos e formarem imunocomplexos que propiciam a produção de IFN- α (MUÑOZ et al., 2010). Os mecanismos do IFN- α incluem a promoção e a diferenciação de monócitos e células dendríticas plasmocitóides,

ativação de células B e T autorreativas, produção de autoanticorpos e a expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (DENG; TSAO, 2014).

A eliminação ineficaz das células mortas pode resultar no acúmulo de células apoptóticas. A presença permanente de detritos celulares apoptóticos em centros germinativos são responsáveis pela ativação das proteínas do sistema complemento e sinalização para a sobrevivência de células B autorreativas, produção de citocinas inflamatórias e inflamação, que será mantida e sustentada em pacientes com LES (MARTINEZ et al., 2016).

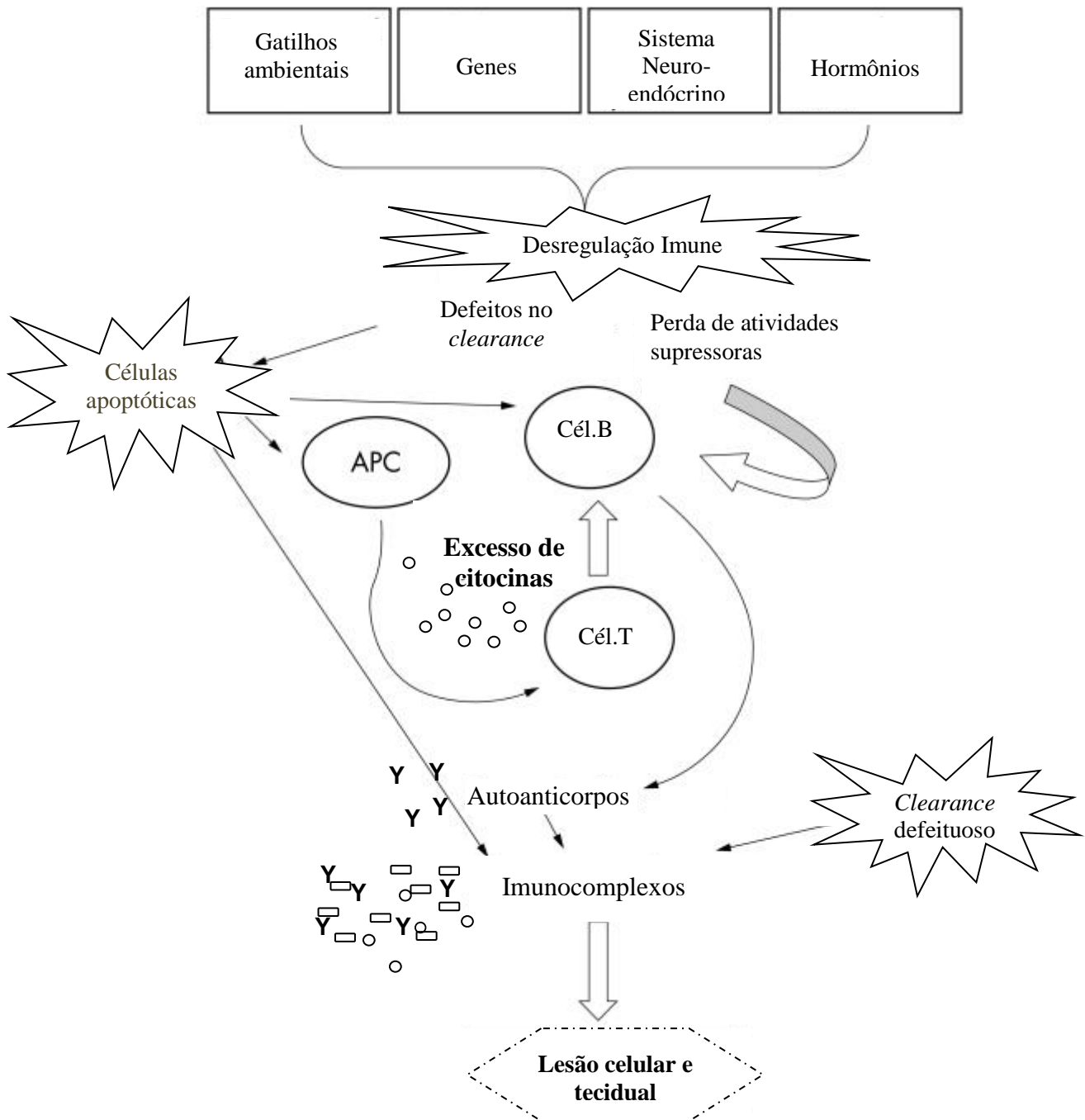


Figura 1 A patogênese do lúpus eritematoso sistêmico (LES). Vários genes conferem susceptibilidade ao desenvolvimento da doença, bem como a interação do sexo, do meio hormonal, do sistema neuro endócrino e a regulação imune defeituosa, como a depuração de células apoptóticas e complexos imunes, modificam essa susceptibilidade. A perda de tolerância imunológica, o aumento da carga antigênica, o excesso de estímulos às células T, o defeito de supressão de células B conduzem ao desequilíbrio das citocinas, à hiperatividade das células B e à produção de autoanticorpos que poderão se depositar e formar imuno complexos patogênicos do LES, com lesão celular e tecidual. APC, célula apresentadora de antígenos. Fonte: Mok, Lau. (2003) adaptada.

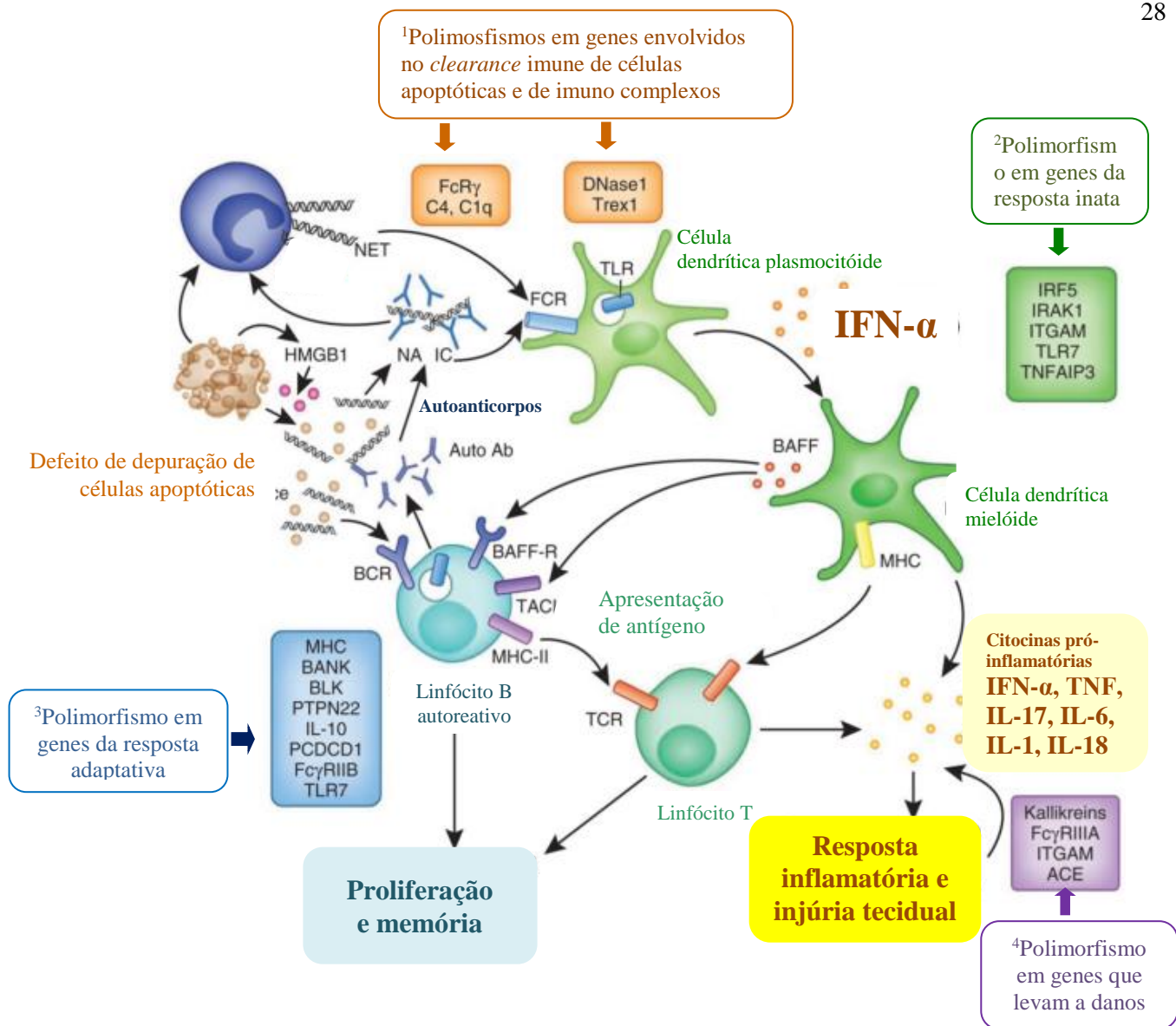


Figura 2 O papel de alguns alelos de risco na patogênese do LES, segundo Liu e Davidson (2013) adaptada. ¹Polimorfismos em genes envolvidos no *clearance* imune de células apoptóticas e de imuno complexos, contendo ácidos nucleicos, podem induzir o aumento da ativação de células apresentadoras de antígenos (células dendríticas plasmocitóides e células dendríticas mielóides) e estimular linfócitos B autoreativos, levando a produção de IFN- α e expansão de células efetoras autoreativas, respectivamente (indicado na caixa de cor LARANJA). ²Os polimorfismo em genes envolvidos na imunidade inata (demonstrados na caixa de cor VERDE) regulam a indução e resposta do IFN- α . A função alterada das células da imunidade inata, por sua vez, contribui para ativação da resposta da imunidade adaptativa. Ambas a imunidade inata e adaptativa contribuem para a resposta inflamatória e danos teciduais. ³Outro grupo de genes polimórficos envolvidos no reconhecimento de ligantes, sinalização de receptores e outras funções imunológicas do sistema imune adaptativo (indicados na caixa de cor AZUL). A desregulação do sistema imune adaptativo resulta em perda da tolerância e produção de autoanticorpos, que por sua vez, se ligam a antígenos nucleares e ativam as células da imunidade inata, completando um *feedback* positivo, amplificando o processo patogênico do LES. ⁴Outros alelos polimórficos também

podem influenciar a severidade de danos teciduais, implicados em lesão direta de órgãos (demonstrado na caixa de cor ROXA).

IRAK1, receptor associado a kinase-1 interleucina-1; ITGAM, subunidade alfa M integrina; TNFAIP3, fator de necrose tumoral proteína alfa induzida 3; BANK, proteína estrutural de célula B com repetições de anquirina; BLK, linfócito B tirosina quinase; PCDCD1, morte celular programada 1; ACE, angiotensina I conversora enzimática (peptidil-dipeptidase A) 1. NA, ácidos nucleicos, IC, imuno complexos.

Fonte: Liu e Davidson (2013) adaptada.

1.4. DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DO LES

O LES é caracterizado por um início insidioso e reúne uma variedade de manifestações clínicas e um diversificado perfil de autoanticorpos. O diagnóstico pode ser difícil, principalmente na fase inicial da doença. O LES pode comprometer a integridade de vários sistemas do corpo humano, em qualquer órgão ou tecido, de forma isolada ou sistêmica e implicam em lesões de pele, sensibilidade ao sol, úlceras orais, artrite, danos renais, ósseos, problemas pulmonares, distúrbios neurológicos, alterações gastrointestinais, alterações hematológicas e cardíacas, entre outros (YU et al., 2014).

O envolvimento dos rins, conhecido como NL, é uma manifestação encontrada em, aproximadamente, 60% dos pacientes e apontada como uma das principais causas de morbidade e mortalidade no LES (MOHAN et al., 2015b). Além disso, o envolvimento renal aumenta o risco de trombose arterial devido ao aumento da prevalência de fatores de risco vascular pelo uso de terapias imunossupressoras agressivas e os efeitos agravantes da doença renal crônica (MOK, 2016).

Os critérios de classificação do LES mais amplamente utilizados foram propostos pelo *American College of Rheumatology* (ACR), revistos e validados pela *Systemic Lupus Collaborating Clinics* (SLICC). A primeira versão foi publicada em 1971 e revista em 1982 e 1997 (HOCHBERG et al., 1997). Embora o objetivo inicial dos critérios fosse apenas classificar a doença, eles se tornaram amplamente utilizados como critérios de diagnóstico clínico. O diagnóstico precoce e preciso de LES, na maioria das vezes, guia-se pelos resultados obtidos no SLEDAI, juntamente aos da pesquisa de autoanticorpos e de outras provas sorológicas que incluem a dosagem de proteínas C3 e C4 do sistema complemento, dosagem dos níveis séricos de citocinas, entre outros (FREIRE et al., 2011).

O escore SLEDAI (Anexo 1) é um índice global que inclui 24 itens, 16 dos quais são critérios clínicos, tais como apreensão, psicose, transtornos mentais orgânicos, perturbação visual, outros problemas neurológicos, perda de cabelo, erupções cutâneas recentes, fraqueza muscular, artrite, inflamação dos vasos sanguíneos, feridas na boca, dor no peito que piora com a respiração profunda, manifestações de pleurisia e/ou pericardite e febre. Oito dos 24 critérios são parâmetros laboratoriais, como alterações no exame de Urina I (proteinúria), níveis séricos de componentes C3 e C4 do sistema complemento, níveis de anticorpos anti-dsDNA, contagem diminuída de plaquetas e de leucócitos totais periféricos. Para o cálculo do SLEDAI, o envolvimento de órgãos é

ponderado; por exemplo, para dor articular e doença renal, a pontuação é multiplicada por quatro, mas o envolvimento do sistema nervoso central é multiplicado por oito. Todos esses itens são pontuados com base na presença ou ausência das manifestações nos últimos 10 dias e o resultado final acumulado pode variar de 0 a 105 pontos. Pontuações maiores que 20 são raras. Um SLEDAI de 6 ou mais tem demonstrado ser consistente com doença ativa que requer tratamento (BOMBARDIER et al., 1992).

Os níveis séricos de complemento C3 e C4 podem estar diminuídos para os pacientes que apresentarem a doença em atividade. Nestes casos, ocorre o consumo de complemento pela formação de complexos autoimunes. Os níveis séricos de complemento voltam a aumentar com a melhora clínica; no entanto, são frequentes os casos de LES em que os valores de complemento não retornam aos valores considerados normais (JOSEPH et al., 2010; KAVANAUGH et al., 2000). A sororeatividade na pesquisa de anticorpos anti-dsDNA é considerada um indicativo importante de atividade da doença (FERREIRA; ÁVILA, 1996).

As tecnologias e plataformas diagnósticas atualmente disponíveis para detectar autoanticorpos do LES avançaram muito, desde os limitados testes de célula LE da década de 1950, a imunofluorescência indireta (IFI) na década de 1960, passando pelos testes de imunodifusão, enzima imunoensaios (ELISA) e recentemente, como o uso do imunoensaios multiplex de alto rendimento, com a capacidade de detectar mais de 30 autoanticorpos em uma única amostra, cada vez mais eficientes e baratos para a prática laboratorial (FRITZLER, 2013).

Apesar disso, a IFI é a técnica rotineiramente empregada para análise de diferentes padrões de fluorescência produzidos por autoanticorpos contra diferentes antígenos celulares nucleares, citoplasmáticos e de superfície celular, presentes no soro de pacientes (FRANCESANTONIO et al., 2014). De acordo com a distribuição topográfica fluorescente nas organelas das células teste (núcleo, nucléolo, citoplasma, aparelho mitótico) serão definidos distintos padrões de fluorescência, relacionados ao diagnóstico de diversas doenças autoimunes. Por exemplo, cerca de 90% dos pacientes com LES apresentam padrão de fluorescência nuclear homogêneo, gerado pela presença de autoanticorpos antinucleares dirigidos contra o dsDNA ou proteínas histonas. Outros autoanticorpos também estão presentes em cerca de 10 a 50% dos indivíduos com LES, direcionados contra os ENAs, o que resulta em um padrão de fluorescência nuclear pontilhado (HIETARINTA; LASSILA, 1996). No entanto, como em diversas outras doenças autoimunes, a maioria dos indivíduos com LES apresenta títulos significativos

de autoanticorpos, mas um indivíduo com reatividade ao ANA, não necessariamente tem LES. Ou seja, anticorpos ANA são biomarcadores de elevada sensibilidade mas de baixa especificidade, sendo úteis na investigação inicial diante da suspeita de LES, considerando o padrão de fluorescência e o título de anticorpos.

1.5. TRATAMENTO DO LES

Por se tratar de uma doença crônica generalizada e incurável, o objetivo do tratamento de pacientes com LES baseia-se na supressão da atividade da doença, prevenção contra os danos orgânicos causados pela resposta autoimune, controle de comorbidades associadas e a prevenção dos efeitos colaterais secundários aos fármacos utilizados (FREIRE et al., 2011). Alcançar estes objetivos conflituosos pode ser difícil. A adesão a regimes de medicamentos muitas vezes é penosa, dado o uso de medicamentos imunossupressores com efeitos colaterais em mulheres jovens em idade reprodutiva.

O tratamento dos pacientes com LES baseia-se, principalmente, na utilização de corticosteróides (prednisona) como o pilar da terapia imunossupressora. No entanto, os corticosteróides induzem ao aparecimento de outros fatores de risco, como hipertensão arterial, hiperinsulinemia, resistência insulínica e obesidade, que também estão correlacionados a eventos cardiovasculares. Outros medicamentos utilizados incluem antimaláricos, como hidroxicloroquina, e imunossupressores não específicos como azatioprina, micofenolato mofetil, ciclofosfamida, entre outros. Em 2011, houve a aprovação do *Compliance belimumab* pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), como tratamento imunobiológico específico para o LES (DHAUN et al., 2011). Identificar e até mesmo prever a atividade da doença torna-se relevante para um planejamento adequado do tratamento do paciente (LIMA et al., 2015). Assim, uma melhor compreensão da regulação e expressão das citocinas no LES poderá fornecer pistas importantes para esclarecer os mecanismos patogênicos que contribuirão para o desenvolvimento de terapias mais eficazes (DAVIS et al., 2011).

1.6. LES E CITOCINAS

Apesar dos avanços recentes na compreensão da rede de citocinas envolvidas na fisiopatologia do LES, o entendimento continua um desafio. A resposta autoimune no LES é mediada por diferentes subpopulações de linfócitos T CD4⁺

autorreativos que desempenham um papel essencial na patogênese da doença (YIN et al., 2015). Após a ativação, os linfócitos periféricos T CD4⁺ *naive* começam a sintetizar e secretar citocinas. As citocinas atuam como fatores de crescimento e de diferenciação autócrinos e, como consequência, os linfócitos T *naive* proliferam e diferenciam-se em células efetoras (CHOI; REISER, 1998). A presença de diferentes citocinas no microambiente das células T CD4⁺ *naive* é vista como o principal fator que determina a diferenciação dessas células em diferentes fenótipos durante a proliferação homeostática (VUKMANOVIC-STEJIC et al., 2000) (Figura 3). Além disso, as citocinas possuem igualmente um papel crítico na regulação das respostas celulares linfóides para a maioria dos estímulos antigênicos na patogênese do LES, incluindo a produção de anticorpos e resposta imune celular (CSISZÁR et al., 2000a; THEOFILOPOULOS et al., 2001b).

Os linfócitos Th efetores representam uma população celular funcionalmente heterogênea. Inicialmente foram identificados por Mosmann et al. (1989), que os dividiram em clones de linfócitos Th de dois subconjuntos: do tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2), de acordo com diferentes funções e padrões de citocinas secretadas. As células Th1 secretam IL-2, IFN- γ e TNF- α , enquanto que os linfócitos Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-25 (também conhecida como IL-17E) (DAVIS et al., 2011). A divisão dos linfócitos em subpopulações levou em consideração principalmente a produção de IFN- γ e de IL-4, uma vez que a síntese das citocinas IL-2, IL-6, e IL-10 não são rigorosamente restritas a um único subconjunto celular (VUKMANOVIC-STEJIC et al., 2000).

A classificação dos linfócitos em Th1 e Th2 conduziu à hipótese de que as células Th1 e suas citocinas estão envolvidas nas doenças autoimunes mediada por células como diabetes *mellitus* tipo 1 dependente de insulina. As células Th2 e suas citocinas proporcionam auxílio às células B na produção de anticorpos e promovem a troca de classe de IgM para IgG1 e IgE e proporcionam uma resposta envolvida em doenças autoimunes mediada por autoanticorpos, como por exemplo, o LES, e ainda promovem o crescimento de mastócitos e diferenciação de eosinófilos, resultando em respostas alérgicas (THEOFILOPOULOS et al., 2001b). Depois da diferenciação, as células T efetoras mostram um padrão estável de produção de citocinas. No entanto, alguns estudos têm esclarecido algumas modificações, como por exemplo, as células Th0 ou *naive* podem deslocar-se para Th1 ou Th2 em resposta a produção local de citocinas, ou uma maior expressão de moléculas coestimulatórias (GAJEWSKI et al., 1994).

As citocinas são proteínas solúveis e de baixo peso molecular, que

exercem um importante papel na diferenciação, maturação e ativação de diversas células inflamatórias (YAP et al., 2010). Os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias são responsáveis por conduzir a uma exacerbação da resposta inflamatória, apoptose e produção de autoanticorpos capazes de iniciar e manter a atividade da resposta autoimune do LES, implicando no desequilíbrio do microambiente imunológico local e sistêmico (YANIV et al., 2015; POSTAL et al., 2013; YAP et al., 2010). O conhecimento sobre as atribuições das citocinas não só sugere uma moderna visão da patogênese do LES, mas também preconiza diversas aplicações clínicas, auxiliando o diagnóstico e o monitoramento da atividade da doença, além de revelar novos alvos terapêuticos para o tratamento de pacientes com LES (CLARK et al., 2013).

Classicamente, aceitava-se uma participação predominante da resposta humoral Th2 para o LES, mediada por alterações na produção de algumas citocinas, como IL-4, IL-6, IL-10 e produção de autoanticorpos por células B (AKAHOSHI et al., 1999; FUNAUCHI et al., 1998). No entanto, a hipótese mediada pela resposta humoral foi contestada e, nas últimas décadas, os estudos mostram claramente que as citocinas produzidas induzem a expressão de moléculas de coestimulação, afinidade e duração de exposição orientada tanto para a resposta Th1 como Th2. Apesar disso, o paradigma mais completo inclui células dos tipos Treg e Th17. O subconjunto celular Th17 é altamente pró-inflamatório e desempenha um papel importante na iniciação e no desenvolvimento do LES (LU et al., 2016; TALAAT et al., 2015; FONSLow et al., 2013; KOENIG et al., 2012; DOLFF et al., 2011). A IL-10 produzida pelas Treg é uma citocina imunoreguladora e demonstrou uma correlação positiva, com elevados níveis de IL-10 em indivíduos com LES (ERIKSSON et al., 2014; CHUN et al., 2007).

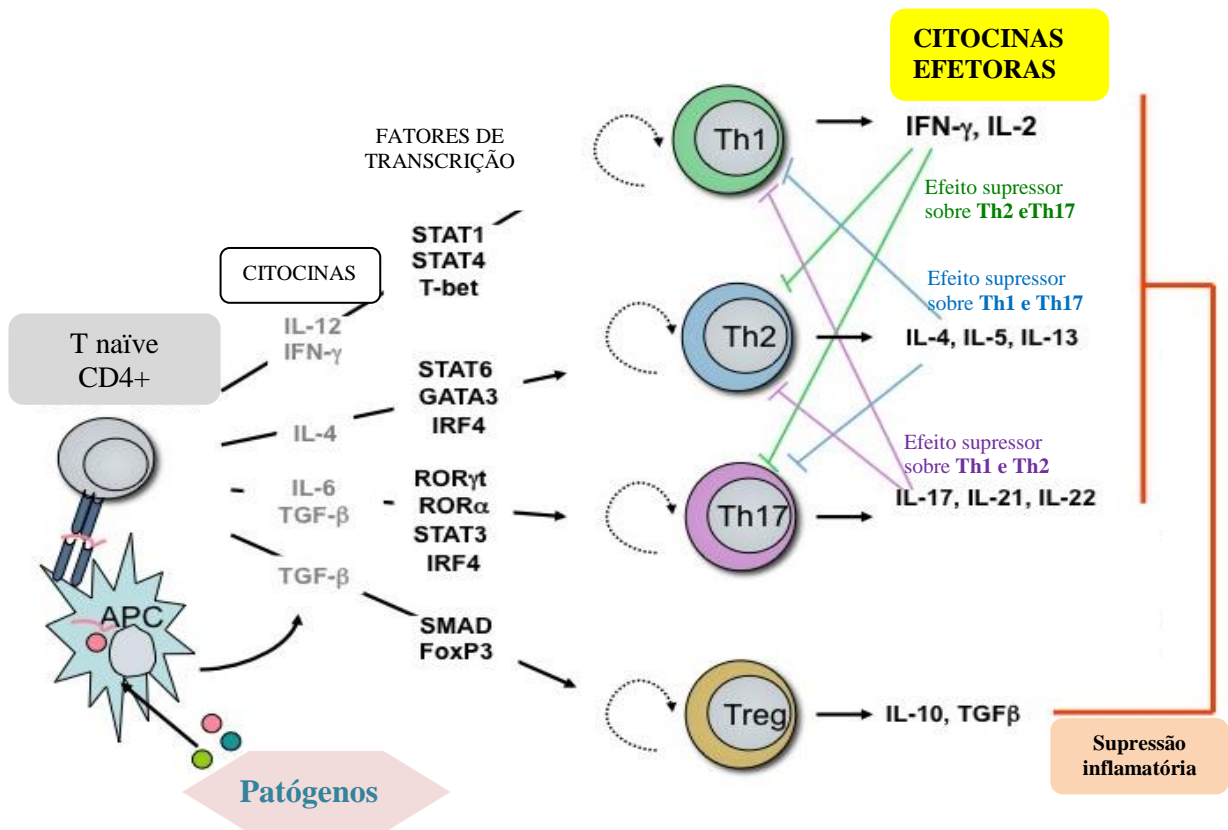


Figura 3 Representação esquemática da diferenciação de células TCD4+ naíve. Com destaque para as citocinas indutoras da diferenciação das células Th1, Th2, Th17 e Treg e as principais citocinas secretadas. Após a ativação, os linfócitos periféricos T CD4+ naíve começam a sintetizar e secretar citocinas. As citocinas atuam como fatores de crescimento e de diferenciação autócrinos e, como consequência, os linfócitos T naíves proliferam e diferenciam-se em células efetoras. A população de linfócitos Th efetores pode ser predominantemente dividida em Th1, Th2, Th17 e Treg, de acordo com diferentes funções e padrões de citocinas secretadas.

Fonte: LOHOFF (2009) adaptada.

1.6.1. INTERLEUCINA 4 (IL-4)

No LES, a IL-4 foi considerada uma citocina chave para modular a resposta Th2 e a imunidade humoral, quando se pensava no seu papel supressor da resposta Th1 e a produção de anticorpos pelas células B. IL-4 é um polipeptídeo de 15 kDa com efeitos pleiotrópicos sobre muitos tipos celulares. É secretada pelas células Th2, células NK, mastócitos e basófilos e desempenha um papel central na regulação da diferenciação de células T *naïve* para produção de mais IL-4, por meio de sinalização mediada por seu receptor específico IL-4R (ELEWA et al., 2014). A IL-4 ativa os fatores de transcrição STAT6 e GATA3 e também regula a ativação da via JAK/STAT, seguindo com desenvolvimento da clássica resposta Th2. Anteriormente, foi demonstrado um aumento da expressão de IL-4 no modelo murino de LES e, nessa ocasião, foi proposto que a IL-4 poderia também estar aumentada no LES humano e dirigir a resposta Th2 dominante na doença (PENG et al., 1997). No entanto, estudos posteriores mostram uma redução significativa nos níveis de IL-4 (ERIKSSON et al., 2014; ARORA et al., 2012; DOLFF et al., 2011) ou, ainda, níveis semelhantes de IL-4 em doentes com LES em comparação com os controles, acompanhados do aumento de outras citocinas com notório perfil pró-inflamatório (TALAAT et al., 2015). Estudos argumentam que os níveis diminuídos de IL-4 poderiam ser adequados para o LES, como resultado do próprio estímulo de IL-4 em células B em produzir anticorpos do tipo não fixadores de complemento, enquanto no LES, os autoanticorpos IgG1 e IgG3 são predominantemente fixadores de complemento (ELEWA et al., 2014; CSISZÁR et al., 2000). Estes resultados corroboram para a quebra do paradigma Th1 vs. Th2, como já havia sido questionado por Theofilopoulos et al. (2001) e abre caminho para o entendimento que os efeitos das citocinas podem ser muito mais complexos do que uma definição simplista de dualismo Th1 vs. Th2 para uma complexa doença autoimune, como o LES.

1.6.2. INTERLEUCINA 6 (IL-6)

IL-6 foi uma das primeiras citocinas estudadas na patogenia de LES devido à sua estreita relação com os linfócitos B. É uma citocina pleiotrópica com várias atividades biológicas e possui múltiplos efeitos pró-inflamatórios potentes, desempenhando uma função crítica na patogênese de LES (TALAAT et al., 2015). É secretada por diversos tipos de células, mas preferencialmente por macrófagos,

monócitos, fibroblastos, células mesangiais renais, células endoteliais e linfócitos T e B (HIRANO, 1998). A sua produção pode ser desencadeada por estímulos de outras citocinas, como IL-1, IL-2 e TNF- α ; porém, também pode ter sua síntese inibida pela ação de IL-4, IL-10 e IL-13 (TACKEY et al., 2004). Um dos efeitos mais importantes da IL-6 é induzir a maturação dos linfócitos B e aumentar a secreção de imunoglobulinas. As suas ações pleiotrópicas também incluem a estimulação da diferenciação e ativação de células linfóides e mielóides, atua como um regulador chave de vários outros processos celulares, incluindo a eritropoiese, a diferenciação de células neuronais, e o metabolismo ósseo, assim como induz a produção de proteínas de fase aguda no fígado, entre outras ações (EL-SHEREEF et al., 2016; ABDEL GALIL et al., 2015; YAP et al., 2010). Os receptores IL-6 (IL-6R) pertencem à superfamília dos receptores das citocinas do tipo 1 e compreendem duas subunidades (IL-6R e a gp130). O acoplamento de IL-6 ao seu receptor é seguido por dimerização de gp130, a ativação JAK1 e a fosforilação da tirosina GP130 (TACKEY et al., 2004). Diversos estudos associam IL-6 com a atividade da doença, com a pontuação SLEDAI, com a reatividade do anti-dsDNA encontrados em altos níveis tanto no soro (ABDEL GALIL et al., 2015; TALAAT et al., 2015) como na urina de alguns pacientes (EL-SHEREEF et al., 2016). Além disso, estudos mostram uma relação particularmente estreita da mediação da IL-6 em danos teciduais, como por exemplo, as manifestações renais (ABDEL GALIL et al., 2015) e neuropsiquiátricas, no fluido cerebrospinal de pacientes com lúpus eritematoso neuropsiquiátrico (LESNP) central (YOSHIO et al., 2016). Portanto, foi sugerido que a IL-6 pode servir tanto para a detecção precoce da exacerbação da doença, como também poderia ser utilizada como biomarcador para monitorar a atividade da doença em resposta ao tratamento (ABDEL GALIL et al., 2015; YAP; LAI, 2013).

1.6.3. INTERLEUCINA 10 (IL-10)

A IL-10 é uma citocina imunoreguladora que desempenha atividades inflamatórias e imunossupressoras potentes sobre as funções de diversos tipos celulares. Esta dupla função apresenta um desafio adicional para interpretação, especialmente no contexto da fisiopatologia das doenças autoimunes. No LES, a IL-10 possui com um papel importante no mecanismo patogênico da doença, especialmente para a produção exacerbada de autoanticorpos pelos linfócitos B (TRIFUNOVIĆ et al., 2015). IL-10 é um polipeptídeo pleiotrópico de 35 kDa, com meia-vida curta e secretada por quase todas as

células do sistema imune inato e adaptativo, tendo em vista assegurar uma rápida disponibilidade em diferentes locais, quando necessário (PENG et al., 2013). Fontes importantes de células secretoras de IL-10 são os macrófagos, monócitos, células Th1 e Th2, linfócitos B, células T citotóxicas, células apresentadoras de antígenos (APCs), células dendríticas, células NK, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, queratinócitos e, até mesmo, por células de carcinoma humano (GASTL et al., 1993). Em parte, esta multiplicidade de tipos celulares produtores de IL-10 antecipa a complexa função dessa citocina, mas ressalta a sua importância (DILILLO et al., 2010).

A IL-10 desempenha as suas funções de regulação pela ligação ao seu receptor transmembrana específico na superfície celular (IL-10R). O receptor é composto por duas cadeias glicoproteicas IL-10R1 e IL-10R2, cuja via de sinalização melhor caracterizada é de inibir a translocação nuclear do NF- κ B e sua atividade de ligação com o DNA (SAXENA et al., 2015).

Pesquisas recentes reforçam a idéia de que a IL-10 é, de fato, a mais potente citocina anti-inflamatória, especialmente pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, apresentação de antígenos e proliferação celular (SAXENA et al., 2015). Este processo envolve a inibição da capacidade das APCs, principalmente macrófagos e células dendríticas, em apresentar antígenos às células T, por intermédio de um efeito inibidor na expressão de moléculas MHC de classe II e subregulação da expressão de moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 (KOPPELMAN et al., 1997) e ainda exerce efeitos supressores diretos sobre as células Th1 (JOSS et al., 2000). Desse modo, ocorre a inibição da produção de IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNF- α , GM-CSF, assim como de IL-10 na forma de *feedback* autócrino (TRIFUNOVIĆ et al., 2015; PENG et al., 2013; YAP et al., 2010). Estes processos são de grande importância para os efeitos anti-inflamatórias e imunossupressivos da IL-10 (BEEBE et al., 2002).

Por outro lado, a IL-10 pode promover seus efeitos pró-inflamatórios estimulantes sobre as respostas imunes humorais, aumentando a expressão de moléculas MHC de classe II em células B, estimulando a proliferação e maturação das células B, contribuindo para a produção e a troca de classe de imunoglobulinas que resultam no aumento da secreção de autoanticorpos (SAXENA et al., 2015; PENG et al., 2013). Entre outras ações, a IL-10 também pode coestimular a produção de citocinas pela ativação direta de células T que levará a um o aumento da secreção de TNF- α , inibindo a produção de IL-4 por clones Th2 e, por consequência, ter um efeito estimulador para a produção de IFN- α (ROBINSON et al., 2015).

O papel da IL-10 na produção de anticorpos tem sido implicado na patogênese de diversas doenças, que podem ser subdivididas em dois tipos: 1) doenças com excesso de produção de IL-10, tais como o LES, melanoma, esclerose sistêmica, linfoma, entre outros, e 2) doenças com produção deficiente de IL-10, como doenças inflamatórias crônicas do intestino (inclui a doença de Crohn, colite ulcerativa), psoríase e artrite reumatóide (PENG et al., 2013; JACOB et al., 2003). O aumento da produção de IL-10 em pacientes com LES foi relatado, pela primeira vez, em 1993 (LLORENTE et al., 1993). Desde então, vários trabalhos descrevem altos níveis de IL-10 em pacientes com LES, correlacionando positivamente com a gravidade da doença (SAXENA et al., 2015; TALAAT et al., 2015; TRIFUNOVIĆ et al., 2015; ERIKSSON et al., 2014; ARORA et al., 2012; CHUN et al., 2007; VIALARD et al., 1999).

Eriksson et al. (2014) encontraram uma correlação positiva entre elevados níveis de IL-10 em indivíduos pré-sintomáticos do LES quando comparados a indivíduos saudáveis. Estudos anteriores já sugeriram que a IL-10 poderia servir como um biomarcador para a atividade da doença e que desempenha um papel chave na patogênese do LES (CHUN et al., 2007a). Dados ainda sugerem que a proporção de IFN- γ /IL-10 é de grande relevância clínica para o aumento da produção de IL-10 em pacientes com LES (TRIFUNOVIĆ et al., 2015). Uma possível explicação seria que o IFN- γ produzido precocemente na doença, como parte da resposta imunitária, têm a capacidade de alterar a função da IL-10 de anti-inflamatória para pró-inflamatória e neste contexto, a IL-10 contribui para a inflamação. Assim, de acordo com as suas múltiplas fontes, IL-10 envolve múltiplas vias celulares e moleculares para suprimir, ou em certos casos para estimular a resposta imunológica (DILILLO et al., 2010).

1.6.4. INTERLEUCINA 17 (IL-17)

Nos últimos anos, o emergente papel inflamatório das células Th17 e sua principal citocina IL-17 vêm ganhando especial atenção nas doenças autoimunes (KONYA et al., 2015). Recentes investigações têm sugerido que altos níveis de IL-17 desempenham um papel central na patogênese do LES (HAMMAD et al., 2016; PANDA et al., 2016; ABDEL GALIL et al., 2015; TALAAT et al., 2015; ELEWA et al., 2014; MARTIN et al., 2014).

As células Th17 são um subconjunto distinto de linfócitos T CD4⁺ nomeados pela sua principal citocina, a IL-17. As citocinas secretadas pelas células Th17

incluem IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 (YAP; LAI, 2013). Diversos estudos sugerem que a presença de fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e uma elevação de certas citocinas inflamatórias, como IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-21, IL-22 e IL-23 compõem o ambiente inflamatório propenso a induzir células produtoras de IL-17, com especial importância para a presença de IL-6, TGF- β e IL-23 (GAFFEN et al., 2014; SINGH et al., 2014; CRISPÍN; TSOKOS, 2010; BETTELLI et al., 2006).

IL-17A, frequentemente referida como IL-17, é uma citocina pró-inflamatória membro fundador da família de proteínas Th17. Foi descoberta em 1993 e revelou cinco outras citocinas homólogas adicionais, denominadas IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F, que compartilham uma região C-terminal conservada, mas possuem segmentos N-terminal que diferem (HYMOWITZ et al., 2001; ROUVIER et al., 1993). No entanto, os membros mais estudados são a IL-17A e IL-17F e ainda assim, a IL-17F partilha 50% de identidade homóloga com a IL-17A (MARTIN et al., 2014). IL-17A é segregada como uma glicoproteína homodimérica transmembranar de tipo I, com um peso molecular de 30-35 kDa, expressa por vários tipos de células do sistema imune inato e adaptativo, incluindo neutrófilos, células NK, mastócitos, células T CD4⁺ e T CD8⁺, bem como em células hematopoiéticas, epiteliais, do músculo liso, fibroblastos, endoteliais e osteoblastos (SINGH et al., 2014; FOSSIEZ et al., 1996).

Os efeitos pró-inflamatórios da IL-17 são exercidos pela sua capacidade para induzir a secreção de quimiocinas que atraem neutrófilos, tais como CXCL1, CXCL5 e CXCL8 (também conhecida como IL-8), proteína quimiotática de monócitos-1 (CCL2) e fatores de crescimento relacionados com a proteína-oncogene- α que recrutam neutrófilos e monócitos. Além disso, a IL-17 também facilita a ativação das células T e infiltração nos tecidos por regulação positiva da expressão de moléculas de adesão intercelular1 (ICAM-1) e amplifica a resposta imune ao induzir a produção da IL-6, promover a síntese do óxido nítrico (NO) e de prostaglandina E2 (PGE2). A IL-17 também conduz a produção de GM-CSF, fatores promotores de remodelação de tecidos e diversos peptídeos antimicrobianos (beta-defensinas, proteínas S100, lipocalina 2) (MARTIN et al., 2014a; YAP; LAI, 2013; CRISPÍN et al., 2010). Adicionalmente, a IL-17 atua em sinergia com outras citocinas importantes, em particular IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-21 e IL-23 e pode estimular os linfócitos B e provocar a inflamação local e lesão de tecidos. Sozinha, a IL-17 apresenta apenas uma modesta atividade de sinalização, mas a sua capacidade de estabelecer relações com outras moléculas aumenta potencialmente sua

eficiência pró-inflamatória (YAP; LAI, 2013).

Recentemente, a IL-17 foi implicada na patogênese de uma ampla variedade de doenças inflamatórias e autoimunes, incluindo psoríase (DURHAM et al., 2015), artrite reumatóide (PANDA et al., 2016), doença inflamatória do intestino (IBD) (CĂTANĂ et al., 2015), esclerose sistêmica (ZHOU et al., 2015), espondilite anquilosante (JETHWA et al., 2016) e LES (MARTIN et al., 2014a). Outros trabalhos ainda demonstraram que as células Th17 também são importantes na defesa do hospedeiro contra bactérias e infecções fúngicas e assim, a IL-17 atua paradoxalmente entre a infecção e autoimunidade (CHUNG et al., 2003; HUANG et al., 2004).

O aumento dos níveis circulantes de IL-17 foi observado em pacientes com LES e se correlacionam com a atividade da doença (HAMMAD et al., 2016; ABDEL GALIL et al., 2015; TALAAT et al., 2015; ELEWA et al., 2014; CRISPÍN et al., 2010). No entanto, os mecanismos celulares exatos que elevam a produção de IL-17 ainda são um desafio. Os dados atuais permitem discutir diversas hipóteses, entre as quais relatam a característica deficiência de células Treg que poderia estar relacionada com níveis anormalmente baixos de IL-2, uma citocina capaz de evitar a geração de células Th17 e que poderia favorecer as células Treg (TALAAT et al., 2015). Além disso, a produção aumentada de citocinas inflamatórias, como IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-21 e IL-23 poderiam determinar a indução da diferenciação e amplificação das células Th17 (SINGH et al., 2014; CRISPÍN et al., 2010). IL-21 exerce uma influência importante para a diferenciação Th17. Ao contrário da IL-6, a IL-21 é sintetizada pelas células Th17 e células Th foliculares, mas não por APCs e, portanto, foi proposto como autoamplificador à resposta Th17 (MANGAN et al., 2006). Além disso, a IL-23 atua sobre células T de memória, resultando em elevados níveis de IL-17 e assegura uma resposta imunitária secundária (AGGARWAL et al., 2003). A expressão aumentada das moléculas coestimuladoras de linfócitos também pode favorecer a diferenciação em Th17 (MARTIN et al., 2014).

1.6.5. INTERLEUCINA 12 (IL-12) E INTERFERON (IFN)

A IL-12 demonstrou ter um papel crucial para a amplificação e expansão do desenvolvimento da resposta Th1. Sabe-se que a família das citocinas IL-12 (IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35) tem importante papel na autoimunidade, partilham algumas características biológicas, mas têm diferenças funcionais (CROXFORD et al., 2014).

A IL-12 é uma citocina pró-inflamatória heterodimérica, constituída por uma cadeia leve de 35 kDa (conhecida como p35 ou IL-12 α) e uma cadeia pesada de 40 kDa (conhecida como p40 ou IL-12 β). O receptor de IL-12 é composto por duas cadeias IL-12R β 1 e IL-12R β 2, expresso principalmente pelas células T ativadas, células NK, linfócitos B e células dendríticas. IL-12 é sintetizada por células inflamatórias ativadas, por exemplo, monócitos, macrófagos, granulócitos, micróglia, células B e células dendríticas (ZUNDLER et al., 2015; PRESKY et al., 1996). A secreção é iniciada em resposta a produtos microbianos, incluindo bactérias, parasitas intracelulares, fungos, RNA de cadeia dupla e DNA bacteriano. No entanto, a ligação dos fagócitos ativados aos receptores TLR por si só, não é suficiente para induzir a produção de IL-12. Constitutivamente, os genes da IL-12 são transcritos em baixos níveis, mas na presença de certas citocinas, tais como IFN- γ , IL-4, IL-13 e IL-27 amplificam a capacidade das células produtora de IL-12 (D'ANDREA et al., 1995). Além disso, a transcrição dos genes *p40* e *p35* também podem ser suprarregulados por sinalização do IFN- γ . A capacidade de IFN- γ em aumentar a produção de IL-12 forma um mecanismo de *feedback* positivo durante processos inflamatórios e resposta Th1 (TRINCHIERI, 2003).

A importância da IL-12 como um indutor de IFN- γ encontra-se não só na sua elevada eficiência, em baixas concentrações, mas também na sua sinergia com muitos outros fatores estimulatórios. O IFN- γ medeia muitas das atividades pró-inflamatórias da IL-12. O IFN- γ tem potencial para induzir as células T *naïve* a se diferenciarem em células Th1 e, portanto, apresenta uma função sinérgica com a IL-12 para favorecer uma resposta Th1 e exemplifica a sua função como uma citocina imunoreguladora, além de promover a conexão entre a resistência inata e imunidade adaptativa (TRINCHIERI, 2003). Logo, a IL-12 tem mostrado ter um papel importante em doenças mediadas por uma resposta de Th1.

Dentre as muitas atividades exercidas pela IL-12, estão o aumento da geração de linfócitos T citotóxicos (CTL) e a atividade citotóxica das células NK por meio da indução de genes que codificam moléculas associadas aos grânulos citotóxicos, tais como perforina e granzimas (TRINCHIERI, 2003). Além disso, na ativação de células B, a IL-12 pode favorecer a produção de determinados isotipos de imunoglobulina (IgG1 aumentada e diminuição da IgE), associados com resposta Th1. Os macrófagos são ativados por IFN- γ para produzir NO sintase e liberam espécies reativas de nitrogênio. Isso resulta em um aumento da função fagocítica e inflamação local (ZUNDLER et al., 2015).

Os pacientes com LES, quando comparados aos controles, demonstram um aumento de perfil de resposta Th1 e níveis significativamente mais elevados de IL-12 (TALAAT et al., 2015). As concentrações de IFN- γ e IL-12 também estão aumentadas no soro de pacientes com LES, particularmente nas fases ativas de doença (POSTAL et al., 2013; KOENIG et al., 2012a; CHUN et al., 2007; TOKANO et al., 1999). Outros estudos mostraram que IFN- γ é uma importante molécula efetora nesta doença (CHUN et al., 2007a; EL-SAYED et al., 2008; SHAH et al., 2010; TOUZOT et al., 2015). A atividade desregulada dessas citocinas durante a inflamação tecidual crônica é prejudicial o suficiente para justificar o interesse que tem sido dado para entender esta citocina no LES. Adicionalmente, dados apontam que as células dendríticas que produzem localmente IL-12 e IFN- γ amplificam o dano glomerular imuno mediado, contribuindo para o desenvolvimento da NL em pacientes com LES (TUCCI et al., 2010). Pacientes com patogênese neuropsiquiátrica no LES apresentaram IFN- γ e outras citocinas detectadas em soro e fluido cefalorraquidiano (WANG et al., 2015). Os dados de Fu et al. (2008) associam a expressão de genes de quimiocinas induzíveis por IFN- γ com a presença de autoanticorpos anti-RNP, anti-Sm em pacientes com LES (FU et al., 2008). Outros trabalhos acrescentam que os níveis aumentados de IFN- γ em indivíduos pré-sintomáticos, mas não em pacientes com LES, são importantes na avaliação da fase inicial da patogênese e poderiam ser considerados na identificação de indivíduos em risco de desenvolvimento da doença, anos antes que os sintomas clínicos estejam aparentes (ERIKSSON et al., 2014).

1.7. IMUNOMODULAÇÃO DAS CITOCINAS E LES

1.7.1. Polimorfismo *Ncol* do *TNF β* , citocinas e LES

O TNF- α e o TNF- β se ligam ao mesmo receptor nas células alvo e fazem parte de uma rede de sinais interativos que orquestram eventos inflamatórios e imunológicos. Os genes *TNF- α* e *TNF- β* estão localizados no cromossomo 6 humano, dentro da região MHC de classe III, a cerca de 850 kb telomérica do locus *HLA-DRB1*, fortemente regulado ao nível da transcrição. Os genes *TNF- α* e *TNF- β* codificam o TNF- α , também chamado de caquetina, e o TNF- β , também conhecido como linfotoxina- α , respectivamente (QIDWAI et al., 2011; SCHOTTE et al., 2005). Trinta e dois polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) e vinte polimorfismos de fatores de

transcrição já foram detectados na região do TNF (QIDWAI et al., 2011). A presença de polimorfismos que levam a variações de sequências do DNA nas regiões promotoras dos genes *TNF- α* e *TNF- β* podem interferir com a regulação da transcrição e, como resultado, influenciar o nível circulante do TNF- α . O TNF- α é uma importante citocina envolvida em reações inflamatórias e na susceptibilidade a doenças infecciosas, neurodegenerativas, câncer e autoimunes, como o LES (QIDWAI et al., 2011). Também foi proposto que a localização do *loci* do gene do *TNF- α* nas proximidades do *locus* HLA-B pode contribuir para a susceptibilidade de doenças autoimunes HLA-associadas, assim como o LES. A conhecida associação entre o LES com antígenos de MHC de classe I e II embasaram estudos sobre o polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) para os genes *TNF- α* e *TNF- β* nesses pacientes, usando a endonuclease de restrição *NcoI* (TOMITA et al., 1993).

O SNP na posição 252 no gene *TNF- β* , consiste em uma guanina (TNF- β -252G) no alelo comum e uma adenina (TNF- β -252A) no alelo variante (MESSER et al., 1991). Segundo a literatura (MESSER et al., 1991; MAJETSCHAK et al., 1999), o polimorfismo *NcoI* do gene do TNF- β estaria localizado em uma região intrônica não codificadora do gene da citocina TNF- β e estaria associado com aumento nos níveis séricos do TNF- α em pacientes com sepse grave.

Alguns estudos mostram que polimorfismos genéticos de *TNF- β* fazem contribuições substanciais para a etiologia, evolução e prognóstico de LES (BETTINOTTI et al., 1993). Diversos trabalhos mostram a associação do polimorfismo *NcoI* do *TNF- β* em indivíduos com LES de origem alemã, japonesa, chinesa e coreana (ZHANG et al., 1997; KIM et al., 1996; MOON et al., 1995; BETTINOTTI et al., 1993b; TOMITA et al., 1993;). Foi demonstrado que o alelo B2 em homozigose do polimorfismo *NcoI* do *TNF- β* tem grande importância quanto à tendência para o desenvolvimento de nefrite em pacientes com LES (KIM et al., 1996; MOON et al., 1995) e associado a susceptibilidade para a sepse (DELONGUI et al., 2011). Além disso, este polimorfismo também foi relacionado com a susceptibilidade à esclerose múltipla (EM) acompanhado do aumento de marcadores inflamatórios e metabólicos (KALLAUR et al., 2014) e outros trabalhos demonstram que pacientes com acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico agudo, com genótipo B2/B2, também apresentaram maior expressão de biomarcadores inflamatórios e metabólicos, associados ao evento isquêmico (PARREIRA et al., 2014). No entanto, pouco se sabe sobre a predisposição genética deste polimorfismo no LES na população brasileira. De acordo com um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, o alelo B2 em homozigose do polimorfismo *NcoI* do *TNF- β* pode ser considerado um biomarcador genético de susceptibilidade ao LES para a população do sul do Brasil, geneticamente heterogênea (KALLAUR et al., 2010).

As alterações produzidas nos níveis de TNF- α tem sua importância reconhecida como mediador potente da resposta inflamatória, na regulação da proliferação e morte celular, promove a diferenciação de monócitos e macrófagos, estimula a proliferação de células B, o aumento da expressão de moléculas de adesão, a ativação de células T e neutrófilos e desempenha uma função coestimuladora para a produção de anticorpos, exercendo papel na patogênese do LES (SEDGER et al.; 2014; FARID et al., 2011; POSTAL et al., 2011). Além disso, foi demonstrada a eficiência do TNF- α na estimulação da produção de uma cascata de quimiocinas e citocinas, como IL-1 e IL-6 (ANTONELLI et al., 2011;).

1.7.2. Vitamina D [1, 25(OH)D], citocinas e LES

A 1, 25(OH)D é um hormônio esteróide que recentemente ganhou atenção por ter excedido a sua função tradicionalmente entendida na saúde óssea e homeostase do cálcio para ser reconhecida por seu importante papel da modulação da resposta imune e autoimunidade (YAP; MORAND, 2015). As evidências sugerem que a vitamina D tem um efeito inibitório sobre o desequilíbrio imunológico relacionado com LES (YAP et al., 2015; MANDAL et al., 2014; ABOU-RAYA et al., 2013).

Vários estudos têm observado que a vitamina D pode ser associada com regulação negativa da resposta imune Th1 e Th17, a inibição da maturação de células dendríticas, diminuição da produção de IgG por células B, importante efeito imunomodulador sobre a ativação das células T e B, redução da produção de células B de memória, melhora significativa na redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-18, TNF- α , IFN- α) e de anticorpos anti-dsDNA, C4 e, assim, contribuindo com a diminuição da atividade da doença (ABOU-RAYA et al., 2013; TERRIER et al., 2012; RITTERHOUSE et al., 2011; BEN-ZVI et al., 2010; LEMIRE et al., 1984). Descobertas recentes chamaram atenção para presença de receptores de vitamina D na superfície das células que fazem parte do sistema imunológico, incluindo as APCs, células NK, linfócitos T e B.

Os pacientes com LES têm uma maior deficiência de vitamina D em relação a população em geral, em virtude da comum fotossensibilidade à radiação UV e assim, são aconselhados a tomar medidas de proteção solar (MULLER, 1995). A quantidade insuficiente de vitamina D disponível em alimentos, aliada a falta de exposição solar adequada ou ainda, o uso de protetor solar, corroboram a predispor o

paciente com LES à deficiência de vitamina D e com isso, acelerar efeitos adversos sobre muitos tecidos e órgãos (KOKIC et al., 2015). Adicionalmente, as células T quiescentes expressam receptores de vitamina D em baixas concentrações, mas aumentam em cinco vezes quando ativadas e são hábeis em diminuir a proliferação de todas as células Th, diminuir a produção de citocinas inflamatórias IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-18, TNF- α e IFN- γ , bem como inibir a maturação de células dendríticas e a diferenciação monocítica em macrófagos, com o propósito de atenuar resposta pró-inflamatória (KOKIC et al., 2015; MAHON et al., 2003).

1.7.3. Cortisol, citocinas e LES

O cortisol é conhecido por ter uma importante ação imunomoduladora e efeitos imunossupressores, exercendo um *feedback* negativo sobre citocinas pró-inflamatórias, sendo relacionado a inibição da resposta Th1 (IFN- γ , IL-2) e IL-1, TNF- α , e também induzir a resposta imune do tipo Th2 (IL-4, IL-10 e IL-13) (CUTOLO et al., 1998). Os pacientes com LES são conhecidos pela reduzida capacidade de resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o que implica níveis mais baixos de cortisol (GUTIÉRREZ et al., 1998).

1.7.4. Proteína C reativa (PCR), citocinas e LES

Níveis aumentados de PCR estão correlacionados com a atividade da doença em diversas doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide. No entanto, os níveis de PCR avaliados pelos métodos convencionais como nefelometria e turbidimetria com sensibilidade analítica de 3,0 mg/L, apresentam resultados dentro das estimativas normais ou apenas modestamente elevados durante o curso do LES em atividade. Nesta ocasião, acredita-se que o aumento dos níveis de PCR só poderiam sinalizar diferenças críticas, tal como os momentos de recaída e condições de infecção, uma complicação comum, característica da doença (GAITONDE; SAMOLS; KUSHNER, 2008). No entanto, com o advento dos ensaios de PCR de alta sensibilidade (hsPCR), estudos relataram níveis de hsPCR mais elevados no LES, mesmo quando a infecção não estava presente (REXRODE et al., 2003). No LES, os fatores de risco cardiovasculares, a atividade da doença, o uso de terapias corticosteróides e a presença de infecção também foram associados com o altos níveis de IL-6 e outras citocinas, e também com o aumento

dos níveis de hsPCR (MOK et al., 2013; BERTOLI et al., 2008; LEE et al., 2008).

1.7.5. Índice de Massa Corpórea (IMC), SLEDAI, anti-dsDNA e LES

SLEDAI, ANA e anti-dsDNA são variáveis importantes que contribuem para a atividade e o diagnóstico da doença (YANG et al., 2015; EL-SAYED et al., 2008). O aumento do IMC, acompanhado da medida da circunferência abdominal (CA) são responsáveis por maior pontuação no índice SLEDAI, uma vez que contribuem para aumentar o estado inflamatório e estresse oxidativo no LES (LOZOVOY et al., 2011a). Estudos avaliam que a manutenção do peso corporal saudável pode influenciar o diagnóstico e o controle da atividade de algumas doenças autoimunes (TARGOŃSKA-STEPNIAK et al., 2011). A este respeito, as citocinas desempenham um papel crítico adicional aos estímulos antigênicos que predispõem às doenças autoimunes (TALAAT et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA

Na literatura médica, as informações sobre o papel do polimorfismo *NcoI* do *TNF- β* , a presença de IMC, os níveis de vitamina D e cortisol sobre a produção de citocinas em pacientes com LES são limitadas. Para um melhor conhecimento do impacto desses fatores no curso da doença, os valores de SLEDAI, os títulos de ANA e anti-dsDNA foram considerados.

Devido ao importante papel das citocinas na fisiopatologia do LES e na atividade da doença, é de fundamental importância elucidar os possíveis componentes que poderiam modular os níveis de citocinas e quais os perfis de citocinas que estariam associados com a fisiopatologia da doença. Portanto, foi explorada a relação das citocinas em pacientes com LES e, assim, contribuir para compreensão da complexa etiopatogenia da doença.

É de grande interesse clínico determinar modelos de biomarcadores laboratoriais e clínicos que auxiliem o diagnóstico precoce e o monitoramento da atividade da doença.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar se o polimorfismo *NcoI* do *TNF β* , o IMC e os hormônios vitamina D e cortisol estão associados com os níveis séricos de citocinas (valores absolutos ou perfis de citocinas) em pacientes com LES, assim como avaliar modelos de biomarcadores que possam predizer a presença e atividade da doença.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis de citocinas individualmente e em perfis em pacientes com LES e indivíduos saudáveis;
- Avaliar a frequência do polimorfismo *NcoI* do *TNF- β* , os níveis séricos de vitamina D e cortisol, assim como o IMC, dados socio-demográficos (idade, sexo) em pacientes com LES e indivíduos saudáveis;
- Avaliar a associação entre o perfil de citocinas e os dados sócio-demográficos (sexo, idade) e o IMC; a vitamina D; o cortisol; o polimorfismo genético *NcoI* do *TNF- β* e a presença de LES
- Propor modelos de predição da presença de LES utilizando as citocinas plasmáticas individualmente e em perfis;
- Propor modelos de predição de atividade do LES utilizando os valores de SLEDAI, os títulos de ANA e anti-dsDNA e relacionar com as citocinas plasmáticas individualmente e em perfis.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. POPULAÇÃO, AMOSTRA E DELINEAMENTO

Um total de 396 indivíduos foi selecionado para participar no estudo, entre pacientes atendidos no Ambulatório de Reumatologia do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e voluntários do Hospital Universitário da UEL, Londrina, Paraná. O estudo incluiu 200 pacientes com LES e 196 voluntários saudáveis. O LES foi diagnosticado utilizando os critérios revisados do *American College of Rheumatology* (ACR) de 2013 (HOCHBERG et al., 1997). A atividade da doença foi determinada utilizando pontuação SLEDAI (BOMBARDIER et al., 1992).

4.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os critérios de inclusão foram indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos. Os critérios de exclusão foram a presença de doenças da tireóide, supra-renais, renais, hepáticas, gastrointestinais, doenças infecciosas ou oncológicas, terapia de reposição hormonal e suplementos antioxidantes.

4.3. ASPECTOS ÉTICOS, CONSENTIMENTO, SAÚDE E SEGURANÇA

A pesquisa foi conduzida de forma ética e responsável e está em plena conformidade com todas as normas relevantes de experimentação. Além disso, o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL aprovou todos os procedimentos envolvendo os participantes humanos, conforme aprovação de número CAAE: 0186512.0.0000.5231, Parecer CEP n. 210.328, de 04/03/2013 (Anexo 1) da UEL, e um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os indivíduos incluídos no estudo (Apêndices 1 e 2). Esta investigação clínica foi conduzida de acordo com os princípios expressos na Declaração de Helsinki. Todos os procedimentos de saúde e de segurança do laboratório foram obrigatoriamente cumpridos.

4.4. DADOS DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS E MENSURAÇÕES DE PRESSÃO SANGUÍNEA

As informações sobre a história médica foram obtidas na avaliação clínica realizada pela médica reumatologista. Informações sobre a duração da doença, como também a utilização de drogas não esteróides anti-inflamatórios, corticosteróides, antimaláricos, contraceptivos orais, medicamentos anti-hipertensivos e suplementação com vitamina D foram registradas para cada paciente. Os indivíduos de ambos os grupos relataram não fazer uso de bebidas alcoólicas regularmente (Apêndices 3 e 4).

As medidas antropométricas IMC e CA foram avaliadas. O peso corporal foi medido com precisão de 0,1 kg no período da manhã, utilizando uma balança eletrônica, com os indivíduos vestindo roupas leves e sem sapatos; altura foi medida com precisão de 0,1 cm usando um estadiômetro. O IMC foi calculado a partir do peso (kg) dividido pela altura (m) elevado ao quadrado. A CA foi medida com os sujeitos em pé, a meio caminho entre a última costela e a crista ilíaca e expressa em cm. Foram tomadas três mensurações da pressão arterial, com um intervalo de 1 min entre elas. A média destas mensurações foi utilizada na análise, expressas em mmHg.

4.5. MARCADORES LABORATORIAIS

Após jejum de 12 horas, amostra de sangue venoso foi colhida em tudo com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e sem EDTA como anticoagulante, usando tubos estéreis (BD Vacutainer® UltraTouch™, Franklin Lakes, NJ, EUA). O sangue total foi deixado em repouso durante 30 minutos e centrifugado a 1500 rpm durante 10 min. As amostras de plasma e de soro foram separadas e seguidamente distribuídas em alíquotas e armazenadas a -80 °C para análises subsequentes.

Os anticorpos ANA foram quantificados utilizando o método de IFI com células HEp2 como substrato (IFI-ANA-HEp2-IgG, viro-IMMUN LaborDiagnostika, GmbH, Oberursel, Alemanha) e foram considerados significativos quando os títulos resultaram em $\geq 1:160$. Os anticorpos anti-dsDNA foram quantificados utilizando o ensaio imunoenzimático (ELISA, anti-dsDNA, Orgentec Diagnostika, GmbH, Alemanha) e foram considerados significativos quando os resultados obtidos foram ≥ 20 UI/mL. Determinações quantitativas da forma 25 hidroxivitamina D [25(OH)D], cortisol foram realizadas por ensaio imunoenzimático quimioluminescente em micropartículas (CMIA, Architect, Laboratório Abbott, Abbott Park, IL, EUA) e hsPCR por turbidimetria. Os

níveis plasmáticos das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-17 foram determinados utilizando um ensaio imunoenzimático (ELISA) de sanduíche (eBioscience, San Diego, CA, EUA). Os perfis de citocinas foram estabelecidos como perfil pró-inflamatório (IL-1+IL-6+TNF- α), Th1 (IL-12+IFN- γ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-6+IL-17) ou Treg (IL-10).

O DNA genômico foi extraído de células do sangue periférico (*buffy coat*), utilizando um kit de purificação de DNA, de coluna (Biopur, Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Brasil). O gene do *TNF β* foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) e os seguintes iniciadores (*primers*) foram utilizados com base na sequência X02911 (GenBank) (MAJETSCHAK et al., 1999, 2002): *Primer 1* (sense TNF1) 5'CCG TGC TTC GTG CTT TGG GAC TA 3'; e *Primer 2* (antisense TNF2) 5'AGA GGG GTG GAT GCT TGG GTT TC 3' (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). O produto de PCR foi digerido com a enzima de restrição extraída de *Nocardia corallina* (*NcoI*) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) durante 4 h a 37°C. Os genótipos foram identificados pela análise do polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), após correr a eletroforese em gel de agarose a 3% (70 V durante 70 min) e coloração com brometo de etídio. O alelo *TNFB1* inclui um sítio de restrição C[^]CATGG para a *NcoI* que resulta em fragmentos de 196 pares de bases (pb) e 586 pb após a digestão, e o alelo *TNF β 2* (sem o sítio de restrição para *NcoI*) resulta em único fragmento com 782pb. O genótipo heterozigoto *TNF β 1/B2* resulta em três fragmentos (782pb, 586pb e 196pb).

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra foi estatisticamente estimado para cada grupo considerando um poder estatístico de 80% e nível de significância de $p < 0,05$. Foram utilizadas as análises de tabelas de contingência (X^2 -test) para avaliar associações entre as variáveis categóricas ou então, aplicado o Teste de Probabilidade Exato de Fisher, quando necessários. As análises de variância (ANOVAs) também foram utilizadas para avaliar as diferenças entre os grupos em variáveis contínuas, ou foi empregado o teste não paramétrico de Mann-Whitney U quando indicado. O modelo de análise multivariada linear geral (do inglês *multivariate general linear model* - GLM) foi empregado para testar os efeitos multivariados dos preditores (por exemplo, diagnóstico, ajustado por idade, sexo, IMC, etc) sobre os níveis de citocinas ou perfis de citocinas (variáveis

dependentes). Posteriormente, foram utilizados os testes de efeitos interindividuais para verificar os efeitos univariados das variáveis explanatórias significantes. Análises de regressão linear automáticas foram gradualmente aplicadas com SLEDAI, ANA, os anticorpos anti-dsDNA ou hsPCR como variáveis dependentes e as citocinas e perfis de citocinas, sexo, idade e IMC como preditores.

A análise de regressão logística binária gradual automática foi utilizada para delinear as variáveis significativas (níveis de citocinas e perfis, idade, sexo, IMC, ANA, anti-dsDNA) para prever LES. A área sob a curva ROC foi calculada, no intuito de avaliar o desempenho dos dados de citocinas que separam os pacientes com LES e controles. Os valores de citocinas foram transformados em Ln para normalizar a sua distribuição. Consequentemente foram computados os escores-z para cada uma das citocinas e calculados os perfis de citocinas, discriminadamente, como descrito a seguir:

$$\text{Pró-inflamatório} = z\text{IL-1 (z score IL-1)} + z\text{IL-6} + z\text{TNF-}\alpha;$$

$$\text{Th1} = z\text{IL-12} + z\text{IFN-}\gamma;$$

$$\text{Th1 / Th2} = z\text{IL-12} + z\text{IFN-}\gamma/z\text{IL-4};$$

$$\text{Th17} = z\text{IL-6} + z\text{IL-17};$$

$$\text{Th17 / Th2} = z\text{IL-6} + z\text{IL-17}/z\text{IL-4};$$

$$\text{Th1} + \text{Th17} = z\text{IL-6} + z\text{IL-12} + z\text{IL-17} + z\text{IFN-}\gamma;$$

$$\text{Th1} + \text{Th17 / Th2} = z\text{IL-6} + z\text{IL-12} + z\text{IL-17} + z\text{IFN-}\gamma/z\text{IL-4}$$

$$\text{Th1} + \text{Th17 / Th2} + \text{Treg} = z\text{IL-6} + z\text{IL-12} + z\text{IL-17} + z\text{IFN-}\gamma/z\text{IL-4} - z\text{IL-10}$$

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software IBM SPSS, versão Windows 22. Os resultados dos testes bilaterais a um nível alfa de 0,05 ($p < 0,05$) indicaram resultados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. TRABALHO DESENVOLVIDO

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em um artigo científico original para contemplar os objetivos propostos nesta dissertação.

Systemic lupus erythematosus and severity of illness are associated with increased T helper 1, T helper 17 and Treg cytokine profiles and lowered IL-4 production

Lupus: Th1, Th17 and Treg cytokine profiles

Poliana Macedo Guimarães¹, Bruna Miglioranza Scavuzzi², Nicole Perugini Stadtlober³, Lorena Flor da Rosa Santos Silva⁴, Marcell Alysson Batisti Lozovoy⁵, Tathiana Mayumi Veiga Iriyoda⁶, Neide Tomimura Costa⁷, Edna Maria Vissoci Reiche⁸, Michael Maes⁹, Isaias Dichi¹⁰, Andréa Name Colado Simão^{11*}

1. Postgraduate Program in Health Sciences – University of Londrina, Brazil. E-mail address: poliana.mguel@gmail.com
2. Postgraduate Program in Health Sciences – University of Londrina, Brazil. E-mail address: b_miglioranza@yahoo.com.br
3. Postgraduate Program in Experimental Pathology, – University of Londrina, Brazil. E-mail address: lorenafldarosa@yahoo.com.br
4. Postgraduate Program in Experimental Pathology – University of Londrina, Brazil. E-mail address: ni_perugini@hotmail.com
5. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – University of Londrina, Brazil. E-mail address: marcell_lozovoy@hotmail.com
6. Department of Rheumatology – University of Londrina, Brazil. E-mail address: tatimayumi54@gmail.com
7. Department of Rheumatology – University of Londrina, Brazil. E-mail address: neidetom@uol.com.br
8. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – University of Londrina, Brazil. E-mail address: reiche@sercomtel.com.br

9. IMPACT Strategic Research Centre, School of Medicine, Deakin University, Geelong, VIC, Australia. E-mail address: dr.michaelmaes@hotmail.com
10. Department of Internal Medicine – University of Londrina, Brazil. E-mail address: dichi@sercomtel.com.br
11. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – University of Londrina, Brazil. E-mail address: deianame@yahoo.com.br

Corresponding author: Andréa Name Colado Simão.

Postal address: Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – Avenue Robert Koch, n 60. University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86038-440. Tel.: +55-43-3371-2321; Fax: +55-43-3371-2619.

E-mail address: deianame@yahoo.com.br

Highlights

- TNFB1/B1 genotype was accompanied by increased IL-17 and Th17/Th2 ratio while TNFB1/B2 genotype was accompanied by higher IL-4 and IFN- γ values
- SLE was accompanied by Th1, Th17, and Treg profile and lowered IL-4 production.
- 90.4% subjects were correctly classified using Th1+Th17 profiles, IL-10, and IL-4 as predictor variables (sensitivity 66.7%, specificity 96.9%).
- Th1+Th17/Th2 ratio, IL-10 and BMI (positively) and proinflammatory profile (negatively) predicts SLEDAI variance of 20.9%.
- Future new treatments should specifically target Th1, Th2 and Th17 cytokine profiles.

ABSTRACT

The aim of this study was to delineate cytokine profiles associated with systemic lupus erythematosus (SLE) to construct prediction models to help in the diagnosis and disease activity. In this study 200 SLE patients and 196 healthy controls were enrolled. Levels of IL-6, IL-12, IL-17, IFN- γ , IL-10, and Th1/Th2 and Th1+Th17/Th2 ratios were significantly higher while IL-4 was lower in SLE patients compared with controls. 90.4% subjects were correctly classified using Th1+Th17 profiles, IL-10, and IL-4 as predictor variables (sensitivity 66.7%, specificity 96.9%). SLEDAI variance of 20.9% was positively predicted by the Th1+Th17/Th2 ratio, IL-10 and BMI and negatively by proinflammatory profile. TNFB1/B1 genotype was accompanied by increased IL-17 and Th17/Th2 ratio, while TNFB1/B2 genotype was accompanied by higher IL-4 and IFN- γ values. In conclusion, SLE was accompanied by Th1, Th17, and Treg profile and lowered IL-4 production. Future new treatments should specifically target Th1, Th2 and Th17 cytokine profiles.

Key words: systemic lupus erythematosus; cytokine; *TNF β Ncol* polymorphism; cortisol; vitamin D; SLEDAI.

1. INTRODUCTION

Current evidence supports that cytokine levels are altered in systemic lupus erythematosus (SLE) [1–3]. High levels of proinflammatory cytokines are believed to lead to an exacerbation of inflammatory response, apoptosis and production of autoantibody that initiate and sustain SLE disease activity [4,5]. Cytokines are commonly grouped into T helper (Th) 1, Th2, Th17 and regulatory T cells (Tregs) based on their functional effects. In general, it is accepted that a predominant involvement of Th2 response [6] or Th1 and Th2 responses are drivers of SLE autoimmunity [7–9]. However, recent evidences suggest that in addition to Th1 cytokines, such as interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-2, and tumor necrosis factor (TNF)- α and Th2 cytokines, such as IL-4, IL-5 and IL-6 responses, also Th17 (IL-17) and Treg (IL-10) are involved in the immune dysregulation responsible for clinical manifestations and disease activity [1,3,6,7].

Multifactorial components are involved in the immune modulation of cytokines, such as genetic polymorphisms, environmental factors and hormonal alterations, among others, leading to an irreversible damage of self-immunological tolerance. Polymorphisms in the *TNF β* gene are known to be involved in the pathophysiology of the disease and these genetic variants make substantial contributions to the etiology, progression and prognosis of SLE [10]. TNFB2 homozygote genotype of *TNF β* *Nco*I polymorphism (rs909253), for example, could increase the tendency for nephritis development in patients with SLE due to low TNF- α production [11,12]. Among environmental factors, increased body mass index (BMI) has been associated with higher SLE Disease Activity Index (SLEDAI) scores, since it contributes to augmenting inflammatory status and oxidative stress [13].

Among the hormonal factors associated with SLE etiology, cortisol and vitamin D have been studied. SLE patients are known to have diminished hypothalamic-pituitary-

adrenal axis responsiveness, causing tendency towards low cortisol levels [14]. Cortisol is associated with anti-inflammatory and immunosuppressive effects and it possibly inhibits IL-1, TNF- α , Th1-type immune response (IFN- γ and IL-2) and induces Th2-type immune response (IL-4, IL-10, and IL-13) [15]. In addition, vitamin D has been suggested to present a regulatory effect on the immune imbalance associated with SLE [16]. Several studies have observed that vitamin D may be associated with the regulation of Th1 and Th17 immune responses, inhibition of maturation of dendritic cells, down-regulation of T-cell driven IgG production, regulation of inflammation by reducing the levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, IL-18, TNF- α , IFN- α), antibodies against double-stranded DNA (anti-dsDNA), C4 serum levels, memory B cell production, and disease activity [17–21]. Vitamin D also increases the expression of naïve CD4⁺ T cells and IL-10, a cytokine produced by Treg cells [18,22].

Given the important role of the cytokine balance in the pathophysiology of SLE and disease activity, it is crucial to elucidate the possible components that could modulate the cytokine levels and profiles, which would be associated with the pathophysiology of the disease.

Thus, the aim of the present study was to evaluate which cytokine profile predominates in SLE patients and to examine whether *TNF β Ncol* polymorphism, BMI, 25(OH)D and cortisol are associated with serum cytokine levels or their profiles. Another goal was to determine models of cytokine profiles, which could contribute to predict the diagnosis of SLE as well as the disease activity.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Subjects

A total of 396 individuals were carried out to participate in the study. Of them, 200 were patients attended at Rheumatology Outpatient of the University Hospital Specialties Outpatients Clinic (AEHU) and 196 were healthy individuals of the University Hospital of Londrina State University, Londrina, Paraná, Brazil. SLE was diagnosed using the American College of Rheumatology (ACR) 2013 revised criteria [23]. Disease activity was determined by SLEDAI score [24]. Inclusion criteria were patients of both sex and aged from 18 to 65 years. Exclusion criteria were thyroid, adrenal, renal, hepatic, gastrointestinal, infectious or oncological diseases, hormone replacement therapy and antioxidant supplements. Information on medical history was obtained at clinical evaluation. Disease duration and the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs, corticosteroids, antimalarial, oral contraceptives, and antihypertensive medications were recorded for each patient. The individuals of both groups self-reported that they did not drink alcohol regularly.

The Ethical Committee of the University of Londrina, Paraná, Brazil approved all procedures involving human participants. This clinical investigation was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all the participants, who had acknowledgement that they would not be identified. All mandatory laboratory health and safety procedures have been complied.

2.2. Anthropometric and blood pressure measurements

Anthropometric measurements and laboratorial parameters were assessed. Body

weight was measured to the nearest 0.1 kg in the morning by using an electronic scale, with individuals wearing light clothing and no shoes; height was measured to the nearest 0.1 cm by using a stadiometer. BMI was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. Waist circumference (WC) was measured on standing subjects midway between the lowest rib and the iliac crest. Three blood pressure measurements taken with a 1-min interval after the participant had been seated were recorded on the left arm. The mean of these measurements was used in the analysis.

2.3. Biochemical, immunological, and hematological biomarkers

After fasting for 12 hours, venous blood was withdrawn with ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) and without EDTA as anticoagulant using sterile tubes (BD Vacutainer® UltraTouch™, Franklin Lakes, NJ, USA). Whole blood was allowed to stand for 30 min and centrifuged at 1500 rpm for 10 min. Plasma and serum samples were separated and divided into aliquots then stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for subsequent analysis.

Antinuclear antibodies (ANA) were quantified using indirect immunofluorescence with HEp2 cells as substrate (IFI-ANA-HEp2-IgG, VIRO-IMMUN Labor Diagnostika, GmbH, Oberursel, Germany) and were considered significant when titers $\geq 1:160$; anti-dsDNA antibodies were quantified using enzyme-linked immunoassay (ELISA, anti-dsDNA, Orgentec Diagnostika, GmbH, Germany) and were considered significant when titers ≥ 20 IU/mL. Serum levels of high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) were determined using high sensitivity turbidimetry methodology (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA) and the values were expressed as mg/L.

Determination of 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] and cortisol were performed by CMIA (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). Plasma levels of cytokines

TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 and IL-17 were measured using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (eBioscience, San Diego, CA, USA). The cytokine profiles were established as proinflammatory profile (IL-1 + IL-6 + TNF- α), Th1 (IL-12 + IFN- γ), Th2 (IL-4), Th17 (IL-6 + IL-17) or Treg (IL-10).

2.4. *TNF β NcoI genetic polymorphism (rs909253)*

Genomic DNA was extracted from peripheral blood cells (buffy-coat) using a DNA column purification reagent (Biopur, Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Brazil). *TNF β* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) [25,26] and the following primers were utilized based on the X02911 sequence (GenBank): Primer 1 (TNF1 sense) 5' CCG TGC TTC GTG CTT TGG GAC TA 3'; and Primer 2 (TNF2 antisense) 5' AGA GGG GTG GAT GCT TGG GTT TC 3' (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The PCR products were digested with *NcoI* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 4 h at 37°C. The genotypes were identified with a restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay following 3% agarose gel electrophoresis (70 V for 70 min) and ethidium bromide staining. The TNFB1 allele includes a restriction site for *NcoI*, which results in 196 base-pairs (bp) and 586 bp fragments after digestion, and the TNFB2 allele (lacking the restriction site for *NcoI*) results a fragment with 782 bp, whereas from the heterozygous genotype TNFB1/B2 results three fragments (782 bp, 586 bp, and 196 bp).

2.5. *Statistical analysis*

The sample size was estimated statistically for each group considering a statistical power of 80.0% and a significance level of $p < 0.05$. Cal Stat program was used for sample size calculation, based on the average and standard deviation for some of the parameters

evaluated previously in other studies. We used analyses of contingency tables (X^2 -test) to assess associations between categorical variables or used Fisher's exact probability test when appropriated. Analysis of variance (ANOVAs) was used to assess between-group differences in continuous variables or the non-parametric Mann-Whitney U test was used when indicated. Multivariate general linear model (GLM) analyses were used to test the multivariate effects of predictors (e.g. diagnosis, while adjusting for age, sex, BMI, etc) on the cytokine levels or cytokine profiles (dependent variables). Subsequently, tests for between-subject effects were used to check the univariate effects of the significant explanatory variables. Stepwise automatic linear regression analyses were used with SLEDAI, ANA, anti-dsDNA antibodies or CRP as dependent variables and the cytokines and cytokine profiles, sex, age and BMI as predictors. Automatic stepwise binary logistic regression analysis was used to delineate the significant variables (cytokine levels and profiles, age, sex, BMI, ANA, ant-dsDNA) predicting SLE. The area under the receiving operator curve (AUC) was computed in order to evaluate the performance of cytokine data separating SLE from controls. The cytokine values were Ln transformed to normalize their distribution. Consequently, we computed the z-scores for each of the cytokines and computed cytokine profiles or profile ratios, namely: pro-inflammatory = $zIL-1 + zIL-6 + zTNF\alpha$; Th1 = $zIL-12 + zIFN\gamma$; Th1/Th2 = $zIL-12 + zIFN\gamma - zIL-4$; Th17 = $zIL-6 + zIL-17$; Th17/Th2 = $zIL-6 + zIL-17 - zIL-4$; Th1 + Th17 = $zIL-6 + zIL-12 + zIL-17 + zIFN\gamma$; Th1 + Th17/Th2 = $zIL-6 + zIL-12 + zIL-17 + zIFN\gamma - zIL-4$; Th1 + Th17/Th2 + Treg = $zIL-6 + zIL-12 + zIL-17 + zIFN\gamma - zIL-4 - zIL-10$

All statistical analyses were performed using IBM SPSS windows version 22. Tests were 2-tailed and an alpha level of 0.05 indicated statistically significant results.

3. RESULTS

Table 1 Show the socio-demographic data and biomarkers of the subjects enrolled in this study. Patients with SLE were somewhat older than controls. There were significantly more females in the group of SLE patients than in controls and the BMI was somewhat greater in patients than controls. Therefore, we have adjusted our multivariate analyses (Tables 2-6) for possible effects of age, sex and BMI by introducing these variables as additional explanatory variables in the multivariate statistical analyses. There was also a difference in self-declared ethnicity between SLE patients and controls (data not shown). We have also adjusted our data for possible differences in self-declared ethnicity. Non-parametric tests showed that the SLEDAI, ANA and anti-dsDNA were significantly higher in SLE patients than in controls. In fact, the two autoantibody titers were absent in controls. HsCRP levels were significantly higher in SLE patients than controls (F=11.45, df=1/380, p=0.001) These significant differences were still present after covarying for age (F=14.66, df=1/392, p=<0.001), sex (F=19.82, df=1, p=<0.001) and BMI (F=21.41, df=1/376, p<0.001) in an univariate GLM analysis. 25(OH)D was not significantly different between the two studied groups. Plasma cortisol was significantly lower in SLE patients than controls and these significant differences (F=36.57, df=1/233, p<0.001) were still present after covarying for age, sex and BMI (all non-significant). There was no significant association between *TNF β NcoI* polymorphism and SLE.

Table 2 shows the results of multivariate GLM analysis (see GLM analysis 1) with the eight cytokine levels introduced as z-scores obtained on Ln transformations) as dependent variables and diagnosis (SLE *versus* controls) as primary explanatory variable, while adjusting for age, sex and BMI. Diagnosis had a highly significant multivariate effect on the eight cytokine serum levels, while age had a marginally significant multivariate effect and sex and BMI were not significant. Tests of between-subject effects showed that

diagnosis was associated with IL-4, IL-6, IL-12, IL-17, IFN- γ and IL-10, while there were no significant differences in IL-1 and TNF- α between SLE patients and controls.

In order to examine whether 25(OH)D, cortisol levels, and the *TNF β Ncol* polymorphism have a significant impact on the cytokine levels we have entered these variables as additional explanatory variables in the abovementioned multivariate GLM analysis. 25(OH)D had a marginal multivariate effect ($p=0.024$) (see multivariate GLM 2) on the cytokine levels (independently from diagnosis, age, sex and BMI), while univariate analyses showed that 25(OH)D was inversely associated with IFN- γ levels only. The multivariate GLM analysis 3 shows that cortisol had no significant effect on the cytokine levels. We found that *TNF- β Ncol* polymorphism had a significant multivariate effect on the cytokine levels ($F=2.40$, $df=16/368$, $p=0.002$). Therefore, we have examined the effects of the TNFB1/B1, TNFB1/B2 and TNFB2/B2 genotypes on the cytokine levels. Multivariate GLM analysis 4 shows that there were significant effects of both TNFB1/B1 and TNFB1/B2 genotypes on the cytokine levels. Tests for between-subject effects show that the TNFB1/B2 genotype is accompanied by higher IL-4 and IFN- γ than other genotypes, as well as the TNFB1/B1 genotypes is accompanied by highly increased IL-17 levels than other genotypes.

In order to examine whether our data are modulated by the drug treatments, we have introduced the separate drug treatments as additional explanatory variables in the multivariate GLM analysis 1. From all the SLE patients, 142 were treated and 55 were not treated with antimalarial medications; 82 were treated with immunosuppressive drugs (115 untreated); 32 were treated with statins (165 untreated); 40 were treated with mycophenolate (157 untreated) and 13 were treated with hypoglycemic drugs (183 untreated). There were no significant effects of treatment with antimalarial medications ($F=0.69$, $df=8/195$, $p=0.698$), immunosuppressive medications ($F=1.03$, $df=8/195$,

p=0.412), statins (F=0.97, df=8/195, p=0.457), mycophenolate (F=0.40, df=8/195, p=0.921), prednisone (F=1.06, df=8/189, p=0.394) and hypoglycemic drugs (F=0.24, df=8/195, p=0.982) (data not shown).

Table 3 shows the results of multivariate GLM analysis with the eight cytokine ratios (introduced as z-scores) as dependent variables and diagnosis (SLE *versus* controls) as primary explanatory variable, while adjusting for age, sex and BMI. We found that SLE had a highly significant multivariate effect on the cytokine ratios, while age had multivariate effect and BMI and sex were not significant. Tests for between-subject effects showed significant effects of age on IL-4 (p=0.024), IL-12 (p=0.042) and TNF- α (p=0.014) (date not shown). Table 3 also showed that all ratios, except proinflammatory profile, were significantly higher in SLE than in controls. The most significant difference was found for the ratio Th1+Th17/Th2. There were significant effects of age on proinflammatory profile (p=0.015), Th1+Th17 (p=0.005) and Th1 (p=0.009) (date not shown). There was also a significant multivariate effect of *Ncol TNF β* polymorphism on the cytokine ratios (F=2.44, df=10/374, p=0.008) (date not shown) and therefore we have examined the effects of the *Ncol* genotypes. There was a significant multivariate effect of the TNFB1/B1 genotype on the eight cytokine ratios with a significant and positive effect on Th17 and Th17/Th2 only.

Table 4 shows the marginal standard mean values obtained in GLM analysis, which IL-6, IL-12, IL-17, IFN- γ and IL-10 were significantly higher, while IL-4 was lowered in SLE than controls. Table 4 also shows that the TNFB1/B2 genotype is accompanied by higher IL-4 and IFN- γ than other genotypes, as well as the TNFB1/B1 genotypes is accompanied by highly increased IL-17 levels than other genotypes, underscoring the results showed in Table 3.

In order to delineate the most important predictors of SLE, we have carried out automatic stepwise binary logistic regression analysis with SLE as dependent variable and

controls as reference group and with all cytokines, cytokine ratios, ANA and anti-dsDNA antibody titers, age, sex and BMI as independent variables and the significant results were shown in **Table 5**. We found that three biomarkers significantly ($X^2=107.01$, $df=5$, $p<0.001$) predicted SLE, namely Th1+Th17 cytokine profile and IL-10 (both positively associated) and IL-4 (negatively associated). With these biomarkers, 90.4% of all subjects were correctly classified with a sensitivity of 66.7% and a specificity of 96.9% (Nagelkerke=0.621). Consequently, we computed the AUC for the logistic regression probability scores based on Th1+Th17, IL-10 and IL-4 showing that the AUC was 0.895 (± 0.031 , $p<0.001$). For Th1+Th17 using ANA (AUC: 0.881 ± 0.039 , $p<0.001$) and anti-dsDNA antibodies (AUC: 0.628 ± 0.053 , $p=0.010$) showed a lower discriminatory power.

Table 6 to predict the disease activity and delineate which explanatory variables (cytokines and cytokine ratios) were significantly associated with the SLEDAI, ANA and anti-dsDNA antibody titers and hsCRP, we have carried out automatic stepwise univariate regression analyses with these four biomarkers as dependent variables. . The SLEDAI was significantly predicted by the Th1+Th17/Th2 ratio, IL-10 and BMI (all positively) and proinflammatory profile (negatively). ANA titers were predicted by Th1+Th17/Th2 ratio, IL-10 and BMI (all positively) and TNF- α (negatively). The anti-dsDNA titers were better predicted by Th1+Th17 and BMI (positively) and TNF- α (negatively) than other biomarkers. The hsCRP was significantly predicted by the IL-6 and BMI (positively) and sex (negatively).

4. DISCUSSION

The major finding of this study is that plasma levels of IL-6, IL-12, IL-17, IFN- γ , and IL-10 are significantly higher while IL-4 is lower in SLE when compared to controls. Although all SLE patients received medications with anti-inflammatory and/or immunomodulatory properties, none treatment with these immunosuppressive drugs significantly interfered in the results. Moreover, we found that the Th1/Th2 and Th1+Th17/Th2 profiles were significantly higher in SLE, whereas there were no significant differences in the pro-inflammatory cytokines profile. These differences in cytokine profile were highly significant for SLE with an AUC equaling 0.895, which was better than that of ANA (0.881) or anti-dsDNA antibodies (0.628). We also found that 20.9% of the variance in the SLEDAI was predicted by the Th1+Th17/Th2 ratio, increased IL-10 and BMI (all positive) and the proinflammatory profile (negative) association.

Our data are in agreement with previous studies that demonstrated elevated levels of IFN- γ in SLE patients which correlated with disease activity [27–29]. IFN- γ exerts its pathogenic effects by inducing other proinflammatory cytokines, inducing apoptosis in renal cells, and promoting tissue injury when produced in excess [30]. IFN- γ induces accelerated SLE progression, while anti-IFN- γ antibody delayed disease activity, indicating the pathogenic potential of IFN- γ in SLE [30]. In addition, we found that lowered IL-4 levels, a Th2 cytokine, were predictive of SLE and negatively related with severity of illness. An increase in IL-4 expression in the murine model of SLE had been demonstrated leading to a hypothesis that IL-4 could also be increased in human SLE with a dominant Th2 response [31]. However, recent studies have shown either no change in IL-4 in SLE patients [6] or a significant reduction in IL-4 levels [32]. Studies argue that decreased levels of IL-4 would occur in SLE as a result of IL-4 stimulus itself in producing non-complement-fixing antibodies by B-cells. In contrast, autoantibodies in SLE are

predominantly complement-fixing IgG1 and IgG3 [28,33]. These results corroborate the understanding that the effects of cytokines can be much more complex than a simple dualistic definition, such as Th1 vs. Th2 in this complex autoimmune disease. In addition, a more complete paradigm includes Th17 cells, a subset of T cells which is highly proinflammatory and plays a major role in the initiation and development of SLE [34]. Similarly, to our data, Tabarkiewicz et al. (2015) [35] also showed that increased plasma IL-17 concentrations were associated with severity in SLE patients. Finally, in accordance with others studies, we have also shown that increased levels of IL-10 (Treg cytokine) strongly predicted SLE and severity of the illness [27,36]. This cytokine may play a key role in the pathogenesis of SLE because IL-10 enhances antibody secretion, regulates growth and differentiation of B cells and blunts T cell activation and TNF- α secretion. While IL-10 plays an important role in autoantibody generation, it could also have an anti-inflammatory role [5,6], thereby attenuating the inflammatory response in SLE. This could in part explain why we were unable to find a proinflammatory cytokine profile in SLE. Although proinflammatory cytokine profile was not increased, IL-6 levels were significantly higher in SLE than in controls, which corroborates the data from most [37,38], but not all [39] studies. IL-6 plays a critical role in the pathogenesis of SLE, affects auto immune responses increasing autoantibody production, inflammation (promoting Th17 stimulation and Treg suppression) and tissue damage [6,30]. In the present study, the patients did not have increased TNF- α levels, however this cytokine is a valuable biomarker of nephritis in activity [3] and in this cohort, SLE patients did not present this pathological condition.

All together, our data show that SLE is characterized by a Th1+Th17 profile coupled with increased IL-10 and lowered IL-4 production and that an algorithm model based on that cytokine profile could serve as another tool for the diagnosis of SLE. These

results suggest that not only absolute cytokine levels, but cytokine response profiles are important to understand the pathophysiology of SLE. Our findings also corroborate the hypothesis that cytokines and cytokine profiles can modulate autoimmunity without the strict adherence to the classical Th1/Th2 dualism. In this respect, we found that 24.6% of the variance in ANA antibody titers is explained by a Th1+Th17/Th2 cytokine profile, IL-10 levels, BMI (all positive) and TNF- α (negative) association and 16.4% of the variance in levels of anti-dsDNA by a Th1+ Th17 cytokine profile and BMI (positive) and TNF- α (negative) association. ANA are antibodies that target molecules within the nucleus of the host cell with high sensitivity for SLE diagnosis. These findings underscore the importance of Th1 and Th17 interactions with lowered Th2 activity, and increased IL-10 in autoimmune responses in SLE.

Another major finding of the present study is that TNFB1/B1 genotype is accompanied by increased IL-17 and Th17/Th2 ratio, while TNFB1/B2 genotype is accompanied by higher IL-4 and IFN- γ values. We are not aware, to date, of any study, which has reported a cytokine profile associated with *TNF β Ncol* genotypes in SLE. A higher frequency of the TNFB2 allele was found in SLE patients in some [12,40] but not all [41] ethnicities. However, in the present study of SLE patients from Brazilian population, we did not find significant association between *TNF β Ncol* polymorphism and the disease. The difference between previous results and ours may be explained by ethnic difference of genetic background and the high ethnic mixing that occurs in the Brazilian population.

Vitamin D and cortisol were also measured to investigate whether they could have influence on the cytokine levels. We found that 25(OH)D was significantly associated with cytokine profiles in SLE, but not with the diagnosis of the disease. Although SLE patients are commonly photosensitive and, therefore, may have a greater 25(OH)D deficiency than the general population [42], in the present study most of the patients have been treated with

vitamin D. However, our results are in agreement with another study that showed that the levels of 25(OH)D were negatively associated with IFN- γ levels [43]. It was demonstrated that 25(OH)D suppresses adaptive immunity, which leads to the inhibition of proliferation and differentiation of CD4⁺ Th0 cells into Th1 and Th17 cells. 25(OH)D also stimulates Th2 and Treg cells [44]. In relation to cortisol, it is well established that it has an important immunomodulatory action, exerting a negative feedback on proinflammatory cytokines and increasing the production of IL-10 [14]. Thus, the lowered plasma cortisol levels in SLE observed here and in other studies [14] could play a role in aggravating the immune responses.

In SLE, CRP levels are elevated in active disease by conventional assay [45]. Thus, it was believed that increases in CRP levels could only point out the difference between relapse and infection, a common complication due to immunosuppressive therapy in SLE patients [45]. However, with the advent of hsCRP assays, studies reporting higher levels of hsCRP have emerged even when infection was not present. Accordingly, we found significantly higher hsCRP levels in SLE patients than controls. Moreover, we found that 21.4% of the variance in hsCRP was explained by IL-6 and BMI (both positively) and female sex (negatively). Effects of BMI and IL-6 in hsCRP levels in SLE pathogenesis or SLE activity were also shown by Rexrode et al. (2003) [46]. Indeed, a significant part of circulating IL-6 is produced by adipose tissues, while CRP production is mainly determined by IL-6 stimulation [46]. This is also the first study demonstrating that ANA and anti-dsDNA antibody titers are positively associated with BMI. Our research group has previously demonstrated that SLEDAI scores were positively correlated with BMI and waist circumference [13]. To our knowledge, this is the first study to propose a model of diagnosis and activity predictors of SLE using cytokine levels and Th1+Th17/Th2 response ratios together with BMI. Therefore, SLE patients with an increased BMI are at an

increased risk to the noxious effects of increased IL-6 levels. These findings may suggest that reducing BMI may be important in the treatment of SLE activity.

One limitation should be considered in this study, such as the low disease activity shown by SLEDAI of the patients and, therefore, our findings may not be generalized to patients with high disease activity. Further studies should be carried out evaluating SLE patients with severity disease (high SLEDAI) and nephritis activity in order to correctly validate this profile, when the disease is more aggressive. Nevertheless, the present study also has strengths. First, the robust and careful statistical analysis was performed and second, to our knowledge, this is the first study to evaluate the involvement of environmental, hormonal and genetic factors in the cytokine levels in patients with SLE.

CONCLUSION

In conclusion, SLE and disease activity are characterized by Th1, Th17, and Treg profile together with lowered IL-4 production. Serum levels of cytokine and their profiles in SLE are slightly modulated by vitamin D status, BMI and *TNF β Nco1* polymorphism, especially by the TNFB1/B1 genotype. These three factors may aggravate the Th1 and Th17 and related IL-6 responses in SLE. Increased Th1 coupled with increased Th17 but lowered Th2 activities and increased IL-10 levels can be new drug targets in SLE. These results suggest that cytokine modulation strategies have potential for the treatment of SLE as well as the Th1, Th17, and Treg profiles together with lowered IL-4 production may be promise as biomarkers of disease activity.

ACKNOWLEDGMENT

We would like to thank all of the SLE participants for their contributions to our research and to all research group of the Clinical Immunology Laboratory of the University Hospital.

FUNDING

This work was supported by the National Council of Brazilian Research (CNPq), by Brazilian Coordination for the Improvement of Higher-Level-Education Personnel (CAPES) from the Ministry of Education (MEC) of Brazil and Fundação Araucária.

DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

None of the authors has any potential financial conflict of interest related to this manuscript

5. REFERENCES

- [1] R. Lu, M.E. Munroe, J.M. Guthridge, K.M. Bean, D.A. Fife, H. Chen, S.R. Slight-Webb, M.P. Keith, J.B. Harley, J.A. James, Dysregulation of innate and adaptive serum mediators precedes systemic lupus erythematosus classification and improves prognostic accuracy of autoantibodies, *J. Autoimmun.* 74 (2016) 182-193. doi:10.1016/j.jaut.2016.06.001.
- [2] Y. Guo, Q. Chai, Y. Zhao, P. Li, J. Qiao, J. Huang, Increased activation of toll-like receptors-7 and -8 of peripheral blood mononuclear cells and upregulated serum cytokines in patients with pediatric systemic lupus erythematosus, *Int J Clin Exp Med.* 8 (2015) 20472–20480.
- [3] K.F. Koenig, I. Groeschl, S.S. Pesickova, V. Tesar, U. Eisenberger, M. Trendelenburg, Serum cytokine profile in patients with active lupus nephritis, *Cytokine.* 60 (2012) 410–416. doi:10.1016/j.cyto.2012.07.004.
- [4] M. Postal, K.O. Peliçari, N.A. Sinicato, R. Marini, L.T.L. Costallat, S. Appenzeller, Th1/Th2 cytokine profile in childhood-onset systemic lupus erythematosus., *Cytokine.* 61 (2013) 785–91. doi:10.1016/j.cyto.2012.11.023.
- [5] D.Y.H. Yap, K.N. Lai, D.Y.H. Yap, K.N. Lai, Cytokines and their roles in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: from basics to recent advances., *J. Biomed. Biotechnol.* 2010 (2010) 365083. doi:10.1155/2010/365083.
- [6] R.M. Talaat, S.F. Mohamed, I.H. Bassyouni, A.A. Raouf, Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity, *Cytokine.* 72 (2015) 146–153. doi:10.1016/j.cyto.2014.12.027.

- [7] S. Dolff, M. Bijl, M.G. Huitema, P.C. Limburg, C.G.M. Kallenberg, W.H. Abdulahad, Disturbed Th1, Th2, Th17 and Treg balance in patients with systemic lupus erythematosus, *Clin. Immunol.* 141 (2011) 197–204.
doi:10.1016/j.clim.2011.08.005.
- [8] K. Miyake, M. Akahoshi, H. Nakashima, Th subset balance in lupus nephritis., *J. Biomed. Biotechnol.* 2011 (2011) 980286. doi:10.1155/2011/980286.
- [9] A.N. Theofilopoulos, S. Koundouris, D.H. Kono, B.R. Lawson, The role of IFN-gamma in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity., *Arthritis Res.* 3 (2001) 136–41.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11299053> (accessed July 21, 2016).
- [10] M. Bettinotti, K. Hartung, H. Deicher, G. Messer, E. Keller, E. Weiss, E. Albert, Polymorphism of the tumor necrosis factor beta gene in systemic lupus erythematosus: TNFB-MHC haplotypes, *Immunogenetics.* 37 (1993) 449–454.
doi:10.1007/BF00222469.
- [11] H.Y. Kim, S.H. Lee, H.I. Yang, S.H. Park, C.S. Cho, T.G. Kim, H. Han, D.J. Kim, TNFB gene polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus in Korean., *Korean J. Intern. Med.* 10 (1995) 130–6.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7495771> (accessed October 14, 2016).
- [12] S.-J. Moon, M.-K. Park, H.-J. Oh, S.-Y. Lee, S.-K. Kwok, M.-L. Cho, J.H. Ju, K.-S. Park, H.-Y. Kim, S.-H. Park, TNFB Gene Polymorphism in Patients with Systemic Lupus Erythematosus in Korean. *Korean J Intern Med.* 10 (1995) 130–136.
- [13] M. Lozovoy, A. Simao, M. Hohmann, T. Simao, D. Barbosa, H. Morimoto, E.

- Reiche, R. Cecchini, I. Dichi, Inflammatory biomarkers and oxidative stress measurements in patients with systemic lupus erythematosus with or without metabolic syndrome, *Lupus*. 20 (2011) 1356–1364. doi:10.1177/0961203311411348.
- [14] M. A Gutiérrez, M.E. Garcia, J. a Rodriguez, S. Rivero, S. Jacobelli, Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and prolactin secretion in systemic lupus erythematosus., *Lupus*. 7 (1998) 404–408. doi:10.1191/096120398678920343.
- [15] M. Cutolo, A. Sulli, B. Villaggio, B. Seriola, S. Accardo, Relation between steroid hormones and cytokines in rheumatic arthritis and systemic lupus erythematosus, *Ann. Rheum. Diseases*. 57 (1998) 573–577. doi:10.1136/ard.58.1.1.
- [16] K.S. Yap, E.F. Morand, Vitamin D and systemic lupus erythematosus: continued evolution., *Int. J. Rheum. Dis*. 18 (2015) 242–9. doi:10.1111/1756-185X.12489.
- [17] A. Abou-Raya, S. Abou-Raya, M. Helmi, The Effect of Vitamin D Supplementation on Inflammatory and Hemostatic Markers and Disease Activity in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Randomized Placebo-controlled Trial., *J. Rheumatol*. 40 (2013) 265–72. doi:10.3899/jrheum.111594.
- [18] B. Terrier, N. Derian, Y. Schoindre, W. Chaara, G. Geri, N. Zahr, K. Mariampillai, et al., Restoration of regulatory and effector T cell balance and B cell homeostasis in systemic lupus erythematosus patients through vitamin D supplementation, *Arthritis Res. Ther*. 14 (2012) R221. doi:10.1186/ar4060.
- [19] L.L. Ritterhouse, S.R. Crowe, T.B. Niewold, D.L. Kamen, S.R. Macwana, V.C. Roberts, A.B. Dedeke, J.B. Harley, R.H. Scofield, J.M. Guthridge, J.A. James, Vitamin D deficiency is associated with an increased autoimmune response in

- healthy individuals and in patients with systemic lupus erythematosus., *Ann. Rheum. Dis.* 70 (2011) 1569–74. doi:10.1136/ard.2010.148494.
- [20] I. Ben-Zvi, C. Aranow, M. Mackay, A. Stanevsky, D.L. Kamen, L.M. Marinescu, C.E. Collins, G.S. Gilkeson, B. Diamond, J.A. Hardin, The Impact of Vitamin D on Dendritic Cell Function in Patients with Systemic Lupus Erythematosus, *PLoS One*. 5 (2010) e9193. doi:10.1371/journal.pone.0009193.
- [21] J.M. Lemire, J.S. Adams, R. Sakai, S.C. Jordan, 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells., *J. Clin. Invest.* 74 (1984) 657–61. doi:10.1172/JCI111465.
- [22] A. Boonstra, F.J. Barrat, C. Crain, V.L. Heath, H.F.J. Savelkoul, A. O’Garra, 1 ,25-Dihydroxyvitamin D3 Has a Direct Effect on Naive CD4+ T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells, *J. Immunol.* 167 (2001) 4974–4980. doi:10.4049/jimmunol.167.9.4974.
- [23] M.C. Hochberg, Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 40 (1997) 1725–1725. doi:10.1002/art.1780400928.
- [24] C. Bombardier, D. Gladman, M. Urowitz, D. Caron, C. Chang, Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE., *Arthritis Rheum.* 35 (1992) 630–640.
- [25] M. Majetschak, S. Flohe, U. Obertacke, J. Schroder, K. Staubach, D. Nast-Kolb, F.U. Schade, F. Stuber, Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma

- patients, *Ann.Surg.* 230 (1999) 207–214.
- [26] M. Majetschak, U. Obertacke, F.U. Schade, M. Bardenheuer, G. Voggenreiter, B. Bloemeke, M. Heesen, Tumor necrosis factor gene polymorphisms, leukocyte function, and sepsis susceptibility in blunt trauma patients, *Clin Diagn Lab Immunol* 9 (2002) 1205–1211. doi:10.1128/CDLI.9.6.1205.
- [27] H.-Y. Chun, J.-W. Chung, H.-A. Kim, J.-M. Yun, J.-Y. Jeon, Y.-M. Ye, S.-H. Kim, H.-S. Park, C.-H. Suh, Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus., *J. Clin. Immunol.* 27 (2007) 461–6. doi:10.1007/s10875-007-9104-0.
- [28] A. Csiszár, G. Nagy, P. Gergely, T. Pozsonyi, E. Pócsik, Increased interferon-gamma (IFN-gamma), IL-10 and decreased IL-4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE)., *Clin. Exp. Immunol.* 122 (2000) 464–70. doi:10.1046/j.1365-2249.2000.01369.x.
- [29] T. Kim, Y. Kanayama, N. Negoro, M. Okamura, T. Takeda, T. Inoue, Serum levels of interferons in patients with systemic lupus erythematosus., *Clin. Exp. Immunol.* 70 (1987) 562–9.
- [30] B.R. Fonslow, B.D. Stein, K.J. Webb, T. Xu, J. Choi, S. Kyu, J.R.Y. Iii, Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus., *Curr Mol Med.* 10 (2013) 54–56. doi:10.1038/nmeth.2250.
- [31] S.L. Peng, J. Moslehi, J. Craft, Roles of interferon-gamma and interleukin-4 in murine lupus., *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 1936–46. doi:10.1172/JCI119361.
- [32] C. Eriksson, S. Rantapää-Dahlqvist, Cytokines in relation to autoantibodies before onset of symptoms for systemic lupus erythematosus., *Lupus.* 23 (2014) 691–6.

doi:10.1177/0961203314523869.

- [33] E.A. Elewa, O. Zakaria, E.I. Mohamed, G. Boghdadi, The role of interleukins 4, 17 and interferon gamma as biomarkers in patients with Systemic Lupus Erythematosus and their correlation with disease activity, Egypt. Rheumatol. 36 (2014) 21–27. doi:10.1016/j.ejr.2013.10.003.
- [34] A. Hammad, E. Osman, Y Mosaad, M Wahba, Serum interleukin-17 in Egyptian children with systemic lupus erythematosus: is it related to pulmonary affection?, Lupus (2016). Sep 1. pii: 0961203316665709
- [35] J. Tabarkiewicz, K. Pogoda, A. Karczmarczyk, P. Pozarowski, K. Giannopoulos, The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases, Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). 63 (2015) 435–449. doi:10.1007/s00005-015-0344-z.
- [36] V. Arora, J. Verma, V. Marwah, A. Kumar, D. Anand, N. Das, Cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus: a study on northern Indian subjects., Lupus. 21 (2012) 596–603. doi:10.1177/0961203311434937.
- [37] B.J.M. Ripley, B. Goncalves, D. a Isenberg, D.S. Latchman, A. Rahman, Raised levels of interleukin 6 in systemic lupus erythematosus correlate with anaemia., Ann. Rheum. Dis. 64 (2005) 849–53. doi:10.1136/ard.2004.022681.
- [38] M. Linker-Israeli, R.J. Deans, D.J. Wallace, J. Prehn, T. Ozeri-Chen, J.R. Klinenberg, Elevated levels of endogenous IL-6 in Systemic Lupus Erythematosus, Immunology. 147 (1991) 117–123.
- [39] K.P. Metsärinne, D.C.E. Nordström, Y.T. Konttinen, A.M. Teppo, F.Y. Fyhrquist, Plasma interleukin-6 and renin substrate in reactive arthritis, rheumatoid arthritis,

- and systemic lupus erythematosus, *Rheumatol. Int.* 12 (1992) 93–96.
doi:10.1007/BF00290261.
- [40] J. Zhang, R. Ai, F. Chow, The polymorphisms of HLA-DR and TNF B loci in northern Chinese Han nationality and susceptibility to systemic lupus erythematosus., *Chin Med Sci J.* 12 (1997) 107–110.
- [41] R. Goldstein, D.P. Sengar, Comparative studies of the major histocompatibility complex in French Canadian and non-French Canadian Caucasians with systemic lupus erythematosus, *Arthritis Rheum.* 36 (1993) 1121–1127.
- [42] K. Muller, Vitamin D3 metabolism in patients with rheumatic diseases: low serum levels of 25-hydroxyvitamin D3 in patients with systemic lupus erythematosus, *Clin. Rheumatol.* 14 (1995) 397–400.
- [43] V. Kokic, D. Martinovic Kaliterna, M. Radic, D. Perkovic, M. Cvek, V. Capkun, Relationship between vitamin D, IFN- γ , and E2 levels in systemic lupus erythematosus, *Lupus.* 25 (2015) 282–288. doi:10.1177/0961203315605367.
- [44] D. Bikle, Nonclassic actions of vitamin D, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (2009) 26–34. doi:10.1210/jc.2008-1454.
- [45] S. Gaitonde, D. Samols, I. Kushner, C-reactive protein and systemic lupus erythematosus., *Arthritis Rheum.* 59 (2008) 1814–1820. doi:10.1002/art.24316.
- [46] K.M. Rexrode, A. Pradhan, J.E. Manson, J.E. Buring, P.M. Ridker, Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and IL-6 in women, *Ann. Epidemiol.* 13 (2003) 674–682. doi:10.1016/S1047-2797(03)00053-X.

Table 1 Socio-demographic variables and biomarkers data in patients with Systemic lupus erythematosus (SLE) and healthy controls

Variables	Controls (n=196)	SLE (n=200)	F ^A /X ^{2B} / MWU ^C	df	p
Age (years)	36.5 (11.3)	41.2 (13.3)	14.66 ^A	1/392	<0.001
Sex (F/M)	151 / 43	187 / 13	19.82 ^B	1	<0.001
BMI (kg/m ²)	25.1 (4.5)	27.6 (5.8)	21.41 ^A	1/376	<0.001
SLEDAI	0.0 (0.0)	3.68 (3.95)	MWU ^C	–	<0.001
ANA (titre)	0.0 (0.0)	1136 (2050)	MWU ^C	–	<0.001
Anti-dsDNA (U/mL)	0.0 (0.0)	22.8 (106.9)	MWU ^C	–	<0.001
hsCRP (mg/L)	3.0 (5.2)	6.0 (10.8)	11.45 ^A	1/380	0.001
25(OH)D (ng/mL)	29.6 (9.6)	30.9 (8.6)	1.46 ^A	1/288	0.229
Cortisol (µg/dL)	12.1 (5.2)	7.4 (4.7)	36.57 ^A	1/233	<0.001
<i>TNFβ NcoI</i> polymorphism (n)	17/ 97/ 73 ¹	11 /81 /83 ²	2.97 ^B	2	0.226

Results are shown as mean (SD). F: results of analysis of variance (^A); X²: results of analyses of contingency Tables (^B); MWU: Man Whitney U test (^C); F, female; M, male; BMI, body mass index; SLEDAI, SLE Disease Activity Index; ANA, antinuclear antibodies; anti-dsDNA, anti- double-stranded DNA; CRP, C reactive protein; 25(OH)D, 25 hydroxyvitamin D; *TNFβ NcoI* polymorphism, *tumor necrosis factor (TNFβ) NcoI* B1B1/B1B2/B2B2 polymorphism.

¹ n=17 B1/B1, n=97 B1/B2 and n=73 B2/B2 *TNFβ NcoI* polymorphism in healthy controls;

² n=11 B1/B1, n=81 B1/B2 and n=83 B2/B2 *TNFβ NcoI* polymorphism in SLE patients.

Table 2 Results of four different multivariate general linear model (GLM) analyses with the eight cytokine levels as dependents variables

Type test	Dependent variable	Explanatory variable	F	Df	p	Partial Eta Squared
Multivariate 1	All eight cytokines	Diagnosis	12.83	8/196	<0.001	0.344
		Sex (F/M)	0.62	8/196	0.759	0.025
		Age (years)	2.00	8/196	0.049	0.075
		BMI (kg/m ²)	1.17	8/196	0.319	0.046
Between-subject effects	IL-1 (pg/mL)	Diagnosis	0.66	1/203	0.418	0.003
	IL-4 (pg/mL)	Diagnosis	8.69	1/203	0.004	0.041
	IL-6 (pg/mL)	Diagnosis	23.82	1/203	<0.001	0.105
	IL-12 (pg/mL)	Diagnosis	20.24	1/203	<0.001	0.091
	IL-17 (pg/mL)	Diagnosis	16.70	1/203	<0.001	0.076
	TNF- α (pg/mL)	Diagnosis	0.22	1/203	0.883	<0.001
	IFN- γ (pg/mL)	Diagnosis	15.65	1/203	<0.001	0.072
	IL-10 (pg/mL)	Diagnosis	10.12	1/203	0.002	0.048
Multivariate 2	All eight cytokines	25(OH)D (ng/mL)	2.31	8/132	0.024	0.123
Between-subject effects	IFN- γ (pg/mL)	25(OH)D (ng/mL)	-8.76	1/139	0.004	0.059
Multivariate 3	All eight cytokines	Cortisol (μ g/dL)	1.85	1 / 63	0.084	0.190
Multivariate 4	All eight cytokines	<i>TNFβ Ncol</i> polymorphism	2.40	16/368	0.002	
		B1B2 genotype	2.49	8/183	0.014	0.098
		B1B1 genotype	2.38	8/183	0.018	0.094
		Between-subject effects	IL-4 (pg/mL)	B1B2 genotype	3.88	1/190
TNF- α (pg/mL)	B1B2 genotype		6.33	1/190	0.008	0.037
IL-17 (pg/mL)	B1B1 genotype		11.29	1/190	0.001	0.056

F: results of analyses of variance; F, female; M, male; BMI, body mass index; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; All eight cytokines = IL-1, IL-4, IL-6, IL-12, IL-17, TNF- α , IFN- γ , IL-10; B1B2 genotype, *tumor necrosis factor (TNF β) Ncol* polymorphism B1B2 genotype; B1B1 genotype, *tumor necrosis factor (TNF β) Ncol* polymorphism B1B1 genotype.

¹Results of multivariate general linear model (GLM) analysis with diagnosis, sex, age and BMI as explanatory variable. ² Results of GLM analyses with 25(OH)D as explanatory variable. ³ Results of GLM analyses with cortisol as explanatory variable. ⁴ Results of GLM analyses with *TNF β Ncol* polymorphism as explanatory variable.

Table 3 Results of multivariate general linear model (GLM) analysis with the cytokine profiles as dependent variables and diagnosis as explanatory variable while controlling for age, sex and body mass index (BMI)

Type test	Dependent variables	Explanatory variables	F	df	p	Partial Eta Squared
Multivariate 1	All eight cytokines	Diagnosis	19.05	5/199	<0.001	0.324
		Age (years)	2.67	5/199	0.023	0.063
		BMI (kg/m ²)	1.71	5/199	0.135	0.041
		Sex (F/M)	0.41	5/199	0.843	0.010
Between-subject effects	Proinflammatory	Diagnosis	3.19	1/203	0.076	0.015
		Th1	32.89	1/203	<0.001	0.139
		Th1/Th2	50.76	1/203	<0.001	0.200
		Th1 + Th17	53.68	1/203	<0.001	0.209
		Th1 + Th17 / Th2	79.08	1/203	<0.001	0.280
		Th1 + Th17 / Th2 + Treg	48.86	1/203	<0.001	0.194
		Th17	34.54	1/203	<0.001	0.145
		Th17 / Th2	55.44	1/203	<0.001	0.215
Multivariate 2	All eight cytokines	B1B1	3.68	5/187	0.003	0.090
		Between-subject effects	Th17	7.39	1/191	0.007
		Th17/Th2	10.24	1/191	0.002	0.057

All eight cytokines = IL-1, IL-4, IL-6, IL-12, IL-17, TNF- α , IFN- γ , IL-10; **Proinflammatory profile** = IL-1 + IL-6 + TNF- α ; **Th1 profile** = IL-12 + IFN- γ ; **Th2 profile** = IL-4; **Th17 profile** = IL-6 + IL-17; **Th1/Th2 profile** = IL-12 + IFN- γ / IL-4; **Th1 + Th17 profile** = IL-6 + IL-12 + IL-17 + IFN- γ ; **Th1 + Th17 / Th2 profile** = IL-6 + IL-12 + IL-17 + IFN- γ / IL-4; **Th1 + Th17 / Th2 + Treg profile** = IL-6 + IL-12 + IL-17 + IFN- γ / IL-4 + IL-10; **Th17 / Th2 profile** = IL-6 + IL-17 / IL-4; F, female; M, male; IL, interleukin; Th, T helper; Treg, regulatory T; B1B1 genotype, *tumor necrosis factor (TNF β) Ncol* polymorphism B1B1 genotype.

¹Results of multivariate general linear model (GLM) analysis with diagnosis, sex, age and BMI as explanatory variable, while controlling for age, sex and body mass index (BMI); ²Results of multivariate general linear model (GLM) analyses with *TNF β Ncol* polymorphism B1B1 genotype, as explanatory variable, while controlling for diagnosis, age, sex and BMI.

Table 4 Estimated marginal mean standard error (SE) values of cytokine levels and cytokines profiles in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and healthy controls

Variables	Healthy controls	SLE
IL-1 (pg/mL)	0.05 (0.10)	- 0.11 (0.19)
IL-4 (pg/mL)	0.11 (0.09)	- 0.40 (0.17)
IL-6 (pg/mL)	- 0.43 (0.09)	0.38 (0.16)
IL-12 (pg/mL)	- 0.18 (0.09)	0.58 (0.16)
IL-17 (pg/mL)	- 0.03 (0.09)	0.67 (0.16)
TNF- α (pg/mL)	0.05 (0.10)	0.08 (0.17)
IFN- γ (pg/mL)	- 0.18 (0.09)	0.51 (0.17)
IL-10 (pg/mL)	- 0.28 (0.09)	0.27 (0.16)
Proinflammatory	- 0.34 (0.20)	0.35 (0.37)
Th1	- 0.36 (0.13)	1.09 (0.24)
Th1/Th2	- 0.47 (0.15)	1.49 (0.26)
Th1 + Th17	- 0.82 (0.21)	2.14 (0.39)
Th1 + Th17/Th2	- 0.93 (0.21)	2.54 (0.37)
Th1 + Th17/Th2 + Treg	- 0.65 (0.22)	2.28 (0.40)
Th17	- 0.46 (0.14)	1.05 (0.25)
Th17/Th2	- 0.56 (0.14)	1.46 (0.26)
	B1B1 (NO)	B1B1 (YES)
IL-17 (pg/mL)	0.24 (0.11)	1.04 (0.24)
Th17 (pg/mL)	0.23 (0.16)	1.15 (0.35)
Th17/Th2 (pg/mL)	0.35 (0.17)	1.49 (0.36)
	B1B2 (NO)	B1B2 (YES)
IL-4 (pg/mL)	- 0.31 (0.15)	- 0.01 (0.19)
IFN- γ (pg/mL)	- 0.04 (0.15)	0.35 (0.18)

Proinflammatory profile = IL-1 + IL-6 + TNF- α ; **Th1 profile**= IL-12 + IFN γ ; **Th2 profile** = IL-4; **Th17 profile** = IL-6 + IL-17; **Th1/Th2 profile** = IL-12 + IFN- γ / IL-4; **Th1 + Th17 profile** = IL-6 + IL-12 + IL-17 + IFN- γ ; **Th1 + Th17 / Th2 profile** = IL-6 + IL-12 + IL-17 + IFN- γ / IL-4; **Th1 + Th17 / Th2 + Treg profile** = IL-6 + IL-12 + IL-17 + IFN- γ / IL-4 + IL-10; **Th17 / Th2 profile** = IL-6 + IL-17 / IL-4; IL, interleukin; TNF, tumor necrosis factor; IFN, interferon; Th, T helper; Treg, regulatory T; B1B2, *NcoI*, tumor necrosis factor (*TNF β*) *NcoI* polymorphism B1B2, B1B1, *NcoI*, tumor necrosis factor (*TNF β*) *NcoI* polymorphism B1B1.

Table 5 Results of stepwise automatic stepwise logistic regression analysis with systemic lupus erythematosus (SLE) as dependent variable and cytokines levels and cytokines profiles, ANA, anti-dsDNA age, sex and body mass index (BMI) as explanatory variables

	Explanatory variable	Wald	df	p	Odds Ratio	CI 95 %
Regression ¹	Th1 + Th17	25.77	1	<0.001	1.77	1.42 - 2.21
	IL-10 (pg/mL)	10.69	1	0.001	2.49	1.44 - 4.30
	IL-4 (pg/mL)	15.33	1	<0.001	0.08	0.02 - 0.28
	Age (years)	6.51	1	0.011	1.06	1.01 - 1.11
	BMI (kg/m ²)	11.58	1	0.001	1.20	1.08 - 1.33

¹90.4% of all subjects were correctly classified with a sensitivity=66.7% and a specificity of 96.9%

(Nagelkerke=0.621). AUC: Th1+Th17 = 0.895. **Th1+ Th17 profile** = IL-6+IL-12+IL-17+IFN- γ ; Th, T helper; IL, interleukin

Table 6 Results of 4 different automatic stepwise regression analyses with the SLE Disease Activity Index (SLEDAI), antinuclear antibodies (ANA), anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA) and high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) as dependent variables

Dependent variable	Explanatory variable	t	p	F	df	p	R² (%)
SLEDAI	Th1+Th17/Th2	+ 5.45	<0.001	12.70	4/192	< 0.001	20.9
	IL-10 (pg/mL)	+ 2.79	0.006				
	Proinflammatory profile	- 2.23	0.034				
	BMI (kg/m ²)	+ 2.41	0.017				
ANA	Th1+Th17/Th2	+ 6.07	<0.001	16.49	4/202	< 0.001	24.6
	IL-10 (pg/mL)	+ 2.09	0.038				
	TNF- α (pg/mL)	- 2.83	0.005				
	BMI (kg/m ²)	+ 3.80	<0.001				
anti-dsDNA	Th1+Th17	+ 4.69	<0.001	13.32	3/203	< 0.001	16.4
	TNF- α (pg/mL)	- 3.37	0.001				
	BMI (kg/m ²)	+ 3.73	<0.001				
hsCRP	IL-6 (pg/mL)	+ 2.30	0.022	17.89	3/197	< 0.001	21.4
	BMI (kg/m ²)	+ 6.03	<0.001				
	Sex (1=F; 2=M)	- 3.25	0.001				

AUC: Th1+Th17 = 0.895. AUC: ANA = 0.881. AUC: anti-dsDNA = 0.628.

Th1+ Th17/Th2 profile =IL-6+IL-12+IL-17+IFN- γ /IL-4; **Proinflammatory profile**=IL-1 + IL-6 + TNF- α ;
Th1 + Th17 profile = IL-6 + IL-12 + IL-17 + IFN γ ; F: results of analyses of variance; F, female; M, male;
 BMI, body mass index; SLEDAI, SLE Disease Activity Index; ANA, antinuclear antibodies; anti-dsDNA,
 anti-double-stranded DNA; hsCRP, high sensitivity C-reactive protein; tumor necrosis factor (TNF); T helper;
 IL, interleukin.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

- Os pacientes diferiram dos controles quanto ao sexo, idade e IMC. Os pacientes foram mais idosos, apresentaram maior IMC e mais frequentes no sexo feminino, quando comparados aos controles. Não foram observadas alteração significativa dos resultados quando ao uso de medicamentos nos pacientes com LES,
- Não houve associação significativa entre o polimorfismo *Ncol* do *TNFβ* e a presença de LES. Os pacientes apresentaram níveis mais elevados de hsPCR e menores de cortisol, quando comparados aos controles. Já os níveis de 25(OH)D não diferiram entre os grupos controle e LES.
- Todos os perfis de citocinas foram significativamente mais elevados no grupo com LES do que no grupo controle, exceto o perfil pró-inflamatório, que mostrou uma tendência a ser diminuído nos pacientes com LES. A maior diferença significativa foi encontrada para o perfil Th1+Th17/Th2 no grupo de pacientes e controles.
- Os níveis e perfis de citocinas no LES foram marginalmente imunomodulados pelo nível de vitamina D, IMC e polimorfismo *Ncol* do *TNFβ* e podem agravar a resposta Th1 e Th17, juntamente com a IL-6 no LES. Embora os níveis de 25(OH)D e o polimorfismo *Ncol* do *TNFβ* não diferiram entre os grupos controle e LES, os níveis de 25(OH)D foram inversamente associados com os níveis diminuídos de IFN- γ e foi encontrado uma associação significativa entre a presença dos genótipos B1/B1 para a resposta aumentada de Th17 e para o perfil Th17/Th2, enquanto o genótipo B1/B2 foi associado com a diminuição de IL-4 e IFN- γ .
- Os níveis de cortisol foram reduzidos em pacientes com LES; no entanto, não foi encontrado associação entre os níveis de cortisol e os níveis de citocinas.
- O modelo do perfil Th1+Th17 e Treg IL-10 (ambos associados positivamente) e a citocina IL-4 (associada negativamente) classificam corretamente 90,4% de todos os indivíduos com a presença de LES, com sensibilidade de 66,7% e especificidade de 96,9%.

- O SLEDAI foi predito pela razão entre os perfis Th1+Th17/Th2, assim como à citocina Treg (IL-10) e IMC (todos positivamente) e perfil pró-inflamatório (negativamente).
- O aumento dos perfis Th1 + Th17 e Treg (IL-10), juntamente com a diminuição da produção de Th2 (IL-4) foram associados com a presença de LES, bem como com o SLEDAI, ANA, anti-dsDNA e IMC. O perfil de citocinas encontrado foi associado ao diagnóstico de LES, SLEDAI, ANA, anti-dsDNA e IMC em pacientes com LES..

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados deste estudo foram relevantes para contribuir com o entendimento do complexo mecanismo fisiopatológico envolvido no LES. Foi demonstrado que apenas a dosagem das citocinas de modo independente não é tão importante quanto a análise do perfil de citocinas associado ao LES.

O entendimento sobre as anormalidades do processo de regulação imune para o LES está diretamente ligado ao desequilíbrio das respostas Th1, Th17 e Treg, por meio da análise do perfil de citocinas produzidas, bem como fatores que interferem em sua imunomodulação. Assim, estas respostas imunes são sugestivas para novos alvos terapêuticos no LES.

Foi sugerido que o modelo de perfil de citocinas proposto neste estudo pode ser utilizado para identificar indivíduos candidatos ao desenvolvimento da doença. Este modelo fornece ferramentas para selecionar indivíduos em risco de desenvolvimento do LES para futuros estudos prospectivos e ensaios clínicos de prevenção da doença.

O IMC aumentado esteve presente de modo significativo em todos os perfis resultantes da regressão univariada final, que utilizou os parâmetros de diagnóstico e atividade do LES (ANA, anti-dsDNA e SLEDAI, respectivamente) e inflamatórios (hsPCR). Este resultado sugere a importância de uma atenção especial para intervenções alimentares e de qualidade de vida e saúde, terapêuticas e não terapêuticas, para o paciente com LES e para a população em geral, visando contribuir para redução do IMC, um fator modificável que se mostrou associado à presença do LES e à sua atividade.

REFERÊNCIAS

ABDEL GALIL, S. M.; EZZELDIN, N.; EL-BOSHY, M. E. The role of serum IL-17 and IL-6 as biomarkers of disease activity and predictors of remission in patients with lupus nephritis. **Cytokine**, v. 76, n. 2, p. 280–287, 2015.

ABOU-RAYA, A.; ABOU-RAYA, S.; HELMII, M. The Effect of Vitamin D Supplementation on Inflammatory and Hemostatic Markers and Disease Activity in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Randomized Placebo-controlled Trial. **The Journal of Rheumatology**, v. 40, n. 3, p. 265–72, 2013.

AGGARWAL, S. et al. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 3, p. 1910–4, 2003.

AKAHOSHI, M. et al. Th1/Th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 42, n. 8, p. 1644–8, 1999.

ANTONELLI, A. et al. IFN- γ and TNF- α induce a different modulation of interleukin-6 in systemic sclerosis fibroblasts compared to healthy controls. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 40, n. 6, p. 453–6, 2011.

ARINGER, M.; GÜNTHER, C.; LEE-KIRSCH, M. A. Innate immune processes in lupus erythematosus. **Clinical Immunology**, v. 147, n. 3, p. 216–222, 2013.

ARNAUD, L. et al. Autoimmunity Reviews Prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in France: A 2010 nation-wide population-based study. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 11, p. 1082–1089, 2014.

ARNSON, Y.; SHOENFELD, Y.; AMITAL, H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 34, n. 3, p. J258–J265, 2010.

ARORA, V. et al. Cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus: a study on northern Indian subjects. **Lupus**, v. 21, n. 6, p. 596–603, 2012.

AZRIELANT, S.; SHOENFELD, Y. Eppur Si Muove: vitamin D is essential in preventing

and modulating SLE. **Lupus**, v. 25, n. 6, p. 563–72, 2016.

BAE, S. C.; FRASER, P.; LIANG, M. H. The epidemiology of systemic lupus erythematosus in populations of African ancestry: a critical review of the "prevalence gradient hypothesis". **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, n. 12, p. 2091–9, 1998.

BEEBE, A. M.; CUA, D. J.; DE WAAL MALEFYT, R. The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS). **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 4–5, p. 403–12, 2002.

BEN-ZVI, I. et al. The Impact of Vitamin D on Dendritic Cell Function in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9193, 2010.

BERTOLI, A. M. et al. Systemic Lupus Erythematosus in a Multiethnic US Cohort (LUMINA): LXI. Value of C-Reactive Protein as a Marker of Disease Activity and Damage. **Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 12, p. 2355, 2008.

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235–238, 2006.

BETTINOTTI, M. et al. Polymorphism of the tumor necrosis factor beta gene in systemic lupus erythematosus: TNFB-MHC haplotypes. **Immunogenetics**, v. 37, n. 6, p. 449–454, 1993.

BIKLE, D. Nonclassic actions of vitamin D. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 1, p. 26–34, 2009.

BOMBARDIER, C. et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. **Arthritis & Rheumatism**, v. 35, n. 6, p. 630–640, 1992.

BOONSTRA, A. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Has a Direct Effect on Naive CD4+ T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 9, p. 4974–4980, 2001.

CĂȚANĂ, C.-S. et al. Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 19, p. 5823–30, 2015.

CHASSET, F. et al. Influence of smoking on the efficacy of antimalarials in cutaneous lupus: a meta-analysis of the literature. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 72, n. 4, p. 634–639, 2015.

CHOI, P.; REISER, H. IL-4: role in disease and regulation of production. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 113, n. 3, p. 317–9, 1998.

CHUN, H. Y. et al. Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. **Journal of Clinical Immunology**, v. 27, n. 5, p. 461–466, 2007.

CHUNG, D. R. et al. CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 4, p. 1958–63, 2003.

CLARK, D. N. et al. Cytokine inhibition as a strategy for treating systemic lupus erythematosus. **Clinical Immunology**, v. 148, n. 3, p. 335–343, 2013.

COSTANZA, M. et al. Prolactin: A versatile regulator of inflammation and autoimmune pathology. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 3, p. 223–230, 2015.

CRISPÍN, J. C.; HEDRICH, C. M.; TSOKOS, G. C. Gene-function studies in systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, n. 8, p. 476–84, 2013.

CRISPÍN, J. C.; TSOKOS, G. C. IL-17 in systemic lupus erythematosus. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2010, p. 943254, 2010.

CROXFORD, A. L.; KULIG, P.; BECHER, B. IL-12-and IL-23 in health and disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 415–21, 2014.

CSISZÁR, A. et al. Increased interferon-gamma (IFN- γ), IL-10 and decreased IL-4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Clinical and Experimental Immunology**, v. 122, n. 3, p. 464–470, 2000.

CUTOLO, M. et al. Annals of the Rheumatic Diseases. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 57, p. 573–577, 1998.

D'ANDREA, A. et al. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-

12 and tumor necrosis factor alpha production. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 2, p. 537–46, 1995.

DAVIS, L. S.; HUTCHESON, J.; MOHAN, C. The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 31, n. 10, p. 781–9, 2011.

DENG, G.-M.; TSOKOS, G. C. Pathogenesis and targeted treatment of skin injury in SLE. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 11, n. 11, p. 663–9, 2015.

DENG, Y.; TSAO, B. P. Genetic susceptibility to systemic lupus erythematosus in the genomic era. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 6, n. 12, p. 683–92, 2010.

DENG, Y.; TSAO, B. P. Advances in lupus genetics and epigenetics. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 26, n. 5, p. 482–92, 2014.

DHAUN, N.; KLUTH, D. C. Belimumab for systemic lupus erythematosus. **Lancet (London, England)**, v. 377, n. 9783, p. 2079-80–1, 2011.

DILILLO, D. J.; MATSUSHITA, T.; TEDDER, T. F. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1183, n. 1, p. 38–57, 2010.

DINARELLO, C. A. The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 163, n. 6, p. 1177–84, 1991.

DOLFF, S. et al. Disturbed Th1, Th2, Th17 and Treg balance in patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical Immunology**, v. 141, n. 2, p. 197–204, 2011.

DURHAM, L. E.; KIRKHAM, B. W.; TAAMS, L. S. Contribution of the IL-17 Pathway to Psoriasis and Psoriatic Arthritis. **Current Rheumatology Reports**, v. 17, n. 8, p. 55, 2015.

ELEWA, E. A. et al. The role of interleukins 4, 17 and interferon gamma as biomarkers in patients with Systemic Lupus Erythematosus and their correlation with disease activity. **Egyptian Rheumatologist**, v. 36, n. 1, p. 21–27, 2014.

EL-SAYED, M. et al. Correlative Study of Serum Th1/Th2 Cytokines Levels in Patients

with Systemic Lupus Erythematosus with SLEDAI. **Egyptian Dermatology Online Journal**, v. 4, n. 41, 2008.

EL-SHEREEF, R. R. et al. Serum and Urinary Interleukin-6 in Assessment of Renal Activity in Egyptian Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **Clinical Medicine Insights Arthritis and Musculoskeletal Disorders**, v. 9, p. 29–36, 2016.

ERIKSSON, C. et al. Autoantibodies predate the onset of systemic lupus erythematosus in northern Sweden. **Arthritis Research & Therapy**, v. 13, n. 1, p. R30, 2011.

ERIKSSON, C.; RANTAPÄÄ-DAHLQVIST, S. Cytokines in relation to autoantibodies before onset of symptoms for systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 23, n. 7, p. 691–6, 2014.

FARID, T. M. et al. Association of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with juvenile systemic lupus erythematosus nephritis in a cohort of egyptian patients. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, v. 5, n. 6, p. 392–7, 2011.

FESSEL, W. J. et al. Systemic Lupus Erythematosus in the Community: Incidence, Prevalence, Outcome, and First Symptoms; the High Prevalence in Black Women. **Archives of Internal Medicine**, v. 134, n. 6, p. 85–95, 1974.

FLESHER, D. L. T. et al. Recent advances in the genetics of systemic lupus erythematosus. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 6, n. 3, p. 461–79, 2010.

FONSLOW, B. R. et al. Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus. **Current Molecular Medicine**, v. 10, n. 1, p. 54–56, 2013.

FOSSIEZ, F. et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. **Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 6, 1996.

FREIRE, E. A. M.; SOUTO, L. M.; CICONELLI, R. M. Medidas de avaliação em lúpus eritematoso sistêmico. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 1, p. 75–80, 2011.

FRITZLER, M. Reflections on Lupus 2013: butterflies, wolves and prophecies. **Lupus**, v. 22, n. 11, p. 1092–1101, 2013.

FU, Q. et al. Association of elevated transcript levels of interferon-inducible chemokines

with disease activity and organ damage in systemic lupus erythematosus patients. **Arthritis Research & Therapy**, v. 10, n. 5, p. R112, 2008.

FUNAUCHI, M. et al. Decreased Th1-like and increased Th2-like cells in systemic lupus erythematosus. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 27, n. 3, p. 219–24, 1998.

GAFFEN, S. L. et al. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. **Nature Reviews. Immunology**, v. 14, n. 9, p. 585–600, 2014.

GAITONDE, S.; SAMOLS, D.; KUSHNER, I. C-reactive protein and systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 59, n. 12, p. 1814–1820, 2008.

GAJEWSKI, T. F. et al. “Anergy” of TH0 helper T lymphocytes induces downregulation of TH1 characteristics and a transition to a TH2-like phenotype. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 2, p. 481–91, 1994.

GASTL, G. A. et al. Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression. **International Journal of Cancer**, v. 55, n. 1, p. 96–101, 1993.

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

GOLDSTEIN, R.; SENGAR, D. P. Comparative studies of the major histocompatibility complex in French Canadian and non-French Canadian Caucasians with systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, v. 36, n. 8, p. 1121–1127, 1993.

GRIMALDI, C. M. Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 18, p. 456–461, 2006.

GUO, Y. et al. Increased activation of toll-like receptors-7 and -8 of peripheral blood mononuclear cells and upregulated serum cytokines in patients with pediatric systemic lupus erythematosus. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 11, p. 20472–20480, 2015.

GUTIÉRREZ, M. A et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and prolactin

secretion in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 7, n. 6, p. 404–408, 1998.

HAMMAD, A. et al. Serum interleukin-17 in Egyptian children with systemic lupus erythematosus: is it related to pulmonary affection? **Lupus**, 1 set. 2016.

HANLY, J. G. et al. The frequency and outcome of lupus nephritis: results from an international inception cohort study. **Rheumatology**, v. 55, n. 2, p. 252–262, 2016.

HIRANO, T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. **International Reviews of Immunology**, v. 16, n. 3–4, p. 249–84, 1998.

HOUSEY, M. et al. Incidence and Prevalence of Systemic Lupus Erythematosus Among Arab and Chaldean Americans in Southeastern Michigan: The Michigan Lupus Epidemiology and Surveillance Program. **American Journal of Public Health**, v. 105, n. 5, p. e74–e79, 2015.

HUANG, W. et al. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 3, p. 624–31, 2004.

HYMOWITZ, S. G. et al. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 19, p. 5332–41, 2001.

INGVARSSON, R. F.; BENGTSSON, A. A.; JO, A. Variations in the epidemiology of systemic lupus erythematosus in southern Sweden. **Lupus**, v. 25, n.7, p. 772–780, 2016.

JACOB, S. E. et al. Simultaneous measurement of multiple Th1 and Th2 serum cytokines in psoriasis and correlation with disease severity. **Mediators of Inflammation**, v. 12, n. 5, p. 309–13, 2003.

JAKES, R. W. et al. Systematic review of the epidemiology of systemic lupus erythematosus in the Asia-Pacific region: prevalence, incidence, clinical features, and mortality. **Arthritis Care & Research**, v. 64, n. 2, p. 159–68, 2012.

JEGANATHAN, V.; PEEVA, E.; DIAMOND, B. Hormonal milieu at time of B cell activation controls duration of autoantibody response. **Journal of Autoimmunity**, v. 53, p. 46–54, 2014.

JETHWA, H.; BOWNESS, P. The interleukin (IL)-23/IL-17 axis in ankylosing spondylitis: new advances and potentials for treatment. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 183, n. 1, p. 30–6, 2016.

JIANG, F.; LI, S.; JIA, C. Smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: an updated systematic review and cumulative meta-analysis. **Clinical Rheumatology**, v. 34, n. 11, p. 1885–1892, 2015.

JOSS, A. et al. IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 6, p. 1683–1690, jun. 2000.

KALLAUR, A. P. et al. Tumor necrosis factor beta Nco1 genetic polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus in Brazilian patients. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 28, p. S51–S51, 2010.

KALLAUR, A. P. et al. Tumor necrosis factor beta NcoI polymorphism is associated with inflammatory and metabolic markers in multiple sclerosis patients. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 346, n. 1–2, p. 156–163, 2014.

KIM, H. Y. et al. TNFB gene polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus in Korean. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 10, n. 2, p. 130–136, 1995.

KIM, T. et al. Serum levels of interferons in patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 70, n. 3, p. 562–9, 1987.

KIM, T. et al. Systemic lupus erythematosus with nephritis is strongly associated with the TNFB * 2 Homozygote in the Korean Population. **Human Immunology**, v. 46, n.1, p. 10–7, 1996.

KOENIG, K. F. et al. Serum cytokine profile in patients with active lupus nephritis. **Cytokine**, v. 60, n. 2, p. 410–416, 2012.

KOKIC, V. et al. Relationship between vitamin D, IFN- γ , and E2 levels in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 25, n. 3, p. 282–288, 2015.

KONYA, C. et al. Update on the role of Interleukin 17 in rheumatologic autoimmune diseases. **Cytokine**, v. 75, n. 2, p. 207–15, 2015.

KOPPELMAN, B. et al. Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. **Immunity**, v. 7, n. 6, p. 861–71, 1997.

KUHN, A.; WENZEL, J.; WEYD, H. Photosensitivity, apoptosis, and cytokines in the pathogenesis of lupus erythematosus: a critical review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 47, n. 2, p. 148–62, 2014.

LEE, S.-S. et al. Predictors of high sensitivity C-reactive protein levels in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 17, n. 2, p. 114–123, 2008.

LEMIRE, J. M. et al. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 74, n. 2, p. 657–61, 1984.

LIANG, B. et al. Anti-interleukin-6 monoclonal antibody inhibits autoimmune responses in a murine model of systemic lupus erythematosus. **Immunology**, v. 119, n. 3, p. 296–305, 2006.

LIM, S. S. et al. The incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus, 2002–2004: The Georgia lupus registry. **Arthritis and Rheumatology**, v. 66, n. 2, p. 357–368, 2014.

LIMA, J. E. et al. Avaliação do polimorfismo genético *PvuII* do receptor de lipoproteína de baixa densidade (RLDL) em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, n. 1, p. 109–122, 2015.

LINKER-ISRAELI, M. et al. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. **Journal of Immunology**, v. 147, n. 1, p. 117–123, 1991.

LISNEVSKAIA, L.; MURPHY, G.; ISENBERG, D. Systemic lupus erythematosus. **Lancet (London, England)**, v. 384, n. 9957, p. 1878–88, 2014.

LLORENTE, L. et al. Spontaneous production of interleukin-10 by B lymphocytes and monocytes in systemic lupus erythematosus. **European Cytokine Network**, v. 4, n. 6, p. 421–7, 1993.

LOHOFF, M. **B6: Role of interferon regulated factor (IRF) 4 for Th17 differentiation.**

Disponível em: <http://www.imt.uni-marburg.de/loewe/index0cc5.html?option=com_content&view=article&id=40&Itemid=26>

LOZOVYOY, M. et al. Inflammatory biomarkers and oxidative stress measurements in patients with systemic lupus erythematosus with or without metabolic syndrome. **Lupus**, v. 20, n. 13, p. 1356–1364, 2011.

LU, R. et al. Dysregulation of innate and adaptive serum mediators precedes systemic lupus erythematosus classification and improves prognostic accuracy of autoantibodies. **Journal of Autoimmunity**, v.74: p. 182-193, 2016.

MAHON, B. D. et al. The Targets of Vitamin D Depend on the Differentiation and Activation Status of CD4 Positive T Cells. **Journal of Cellular Biochemistry** v. 89, n.5, p. 922–932, 2003.

MAJETSCHAK, M. et al. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. **Annals of Surgery**, v. 230, n. 2, p. 207–214, 1999.

MAJETSCHAK, M. et al. Tumor necrosis factor gene polymorphisms, leukocyte function, and sepsis susceptibility in blunt trauma patients. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 6, p. 1205–1211, 2002.

MAK, A. et al. Global Trend of Survival and Damage of Systemic Lupus Erythematosus: Meta-Analysis and Meta-Regression of Observational Studies from the 1950s to 2000s. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 41, n. 6, p. 830–839, 2012.

MANDAL, M. et al. Vitamin D levels in Indian systemic lupus erythematosus patients: association with disease activity index and interferon alpha. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 1, p. R49, 2014.

MANGAN, P. R. et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231–4, 2006.

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

MARTINEZ, J. et al. Noncanonical autophagy inhibits the autoinflammatory, lupus-like

response to dying cells. **Nature**, v. 533, n. 7601, p. 115–119, 2016.

MCCARTHY, E. M. et al. The association of cytokines with disease activity and damage scores in systemic lupus erythematosus patients. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 53, n. 9, p. 1586–94, 2014.

MESSER G, et al. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an *Nco*I polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, p. 209-219, 1991.

METSÄRINNE, K. P. et al. Plasma interleukin-6 and renin substrate in reactive arthritis, rheumatoid arthritis, and systemic lupus erythematosus. **Rheumatology International**, v. 12, n. 3, p. 93–96, 1992.

MIYAKE, K.; AKAHOSHI, M.; NAKASHIMA, H. Th subset balance in lupus nephritis. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2011, p. 980286, 2011.

MOHAN, C.; PUTTERMAN, C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 6, p. 329–341, 2015.

MOK, C. C. Towards new avenues in the management of lupus glomerulonephritis. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 12, n. 4, p. 221–234, 2016.

MOK, C. C. C. et al. High-sensitivity C-reactive protein, disease activity, and cardiovascular risk factors in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Care and Research**, v. 65, n. 3, p. 441–447, 2013.

MOON, S.-J. et al. TNFB Gene Polymorphism in patients with systemic lupus Erythematosus in Korean . **Korean Journal of Internal Medicine**, v. 10, n. 2, p. 130–136, 1995.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of**

Immunology, v. 7, p. 145–73, 1989.

MULLER, K. Vitamin D3 metabolism in patients with rheumatic diseases: low serum levels of 25-hydroxyvitamin D3 in patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical Rheumatology**, v. 14, p. 397–400, 1995.

MUÑOZ, L. E. et al. The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. **Nature Review Rheumatology**, v. 6, n. 5, p. 280–289, 2010.

NAKASHIMA, C. A. K. et al. Incidence and clinical-laboratory aspects of systemic lupus erythematosus in a Southern Brazilian city. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 3, p. 231–239, 2011.

NASONOV, E. et al. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus (SLE) in selected cities from three Commonwealth of Independent States countries (the Russian Federation , Ukraine and Kazakhstan). **Lupus**, v. 23, n. 2, p. 213–219, 2014.

NIEVES, C. E. F.; IZMIRLY, P. M. Mortality in systemic lupus erythematosus: an updated review. **Curr Rheumatol Rep**, v. 18, n. 4, p. 1–7, 2016.

NOBLE, P. W. et al. DNA-damaging autoantibodies and cancer: the lupus butterfly theory. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n.7, p. 429-434, 2016.

OATES, J. C. The biology of reactive intermediates in systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v. 43, n. 1, p. 56–63, 2010.

PANDA, A. K.; DAS, B. K. Diminished IL-17A levels may protect filarial-infected individuals from development of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Lupus**, 3 ago. 2016.

PENG, H. et al. Role of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in systemic lupus erythematosus. **Clinical Rheumatology**, v. 32, n. 9, p. 1255–66, 2013.

PENG, S. L.; MOSLEHI, J.; CRAFT, J. Roles of interferon-gamma and interleukin-4 in murine lupus. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 8, p. 1936–46, 1997.

PISETSKY, D. S. Anti-DNA antibodies — quintessential biomarkers of SLE. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 2, p. 1–9, 2015.

POSTAL, M. et al. Th1/Th2 cytokine profile in childhood-onset systemic lupus erythematosus. **Cytokine**, v. 61, n. 3, p. 785–91, 2013.

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

PRESKY, D. H. et al. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 24, p. 14002–7, 1996.

QIDWAI, T.; KHAN, F. Tumour Necrosis Factor Gene Polymorphism and Disease Prevalence. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 74, n. 6, p. 522–547, 2011.

R, L. et al. Dysregulation of innate and adaptive serum mediators precedes systemic lupus erythematosus classification and improves prognostic accuracy of autoantibodies. **Journal of Autoimmunity**, v. 74, p. 182-193, 2016.

RAMOS, P. S. et al. Genetic factors predisposing to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. **Seminars in Nephrology**, v. 30, n. 2, p. 164–76, 2010.

REEFMAN, E. et al. Type I interferons are involved in the development of ultraviolet B-induced inflammatory skin lesions in systemic lupus erythematosis patients. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, n. 1, p. 11–18, 2008.

REES, F. et al. The incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus in the UK, 1999-2012. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 1, p. 136-141, 2016.

REKVIG, O. P. The anti-DNA antibody: origin and impact, dogmas and controversies. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 9, p. 530–540, 2015.

REXRODE, K. M. et al. Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and IL-6 in women. **Annals of Epidemiology**, v. 13, n. 10, p. 674–682, 2003.

RIPLEY, B. J. M. et al. Raised levels of interleukin 6 in systemic lupus erythematosus correlate with anaemia. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64, n. 6, p. 849–53, 2005.

RITTERHOUSE, L. L. et al. Vitamin D deficiency is associated with an increased autoimmune response in healthy individuals and in patients with systemic lupus

- erythematosus. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 9, p. 1569–74, 2011.
- ROBINSON, E. S.; WERTH, V. P. The role of cytokines in the pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus. **Cytokine**, v. 73, n. 2, p. 326–334, 2015.
- ROUVIER, E. et al. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 150, n. 12, p. 5445–56, 1993.
- SANTOS, M. J. et al. TNF promoter -308 G>A and LTA 252 A>G polymorphisms in Portuguese patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology International**, v. 32, n. 8, p. 2239–2244, 2012.
- SAXENA, A. et al. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. **Cytokine**, v. 74, n. 1, p. 27–34, 2015.
- SCHOTTE, H. et al. Extended haplotype analysis reveals an association of TNF polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus beyond HLA-DR3. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 34, n. 2, p. 114–121, 2005.
- SCOLNIK, M. et al. Incidence and prevalence of lupus in Buenos Aires, Argentina: a 11-year health management organisation-based study. **Lupus Science & Medicine**, v. 1, n. 1, p. e000021, 2014.
- SEDGER, L. M. et al. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 453–72, 2014.
- SHAH, K. et al. Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, n. 2, p. R53, 2010.
- SINGH, R. P. et al. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 12, p. 1174–81, 2014.
- SOMERS, E. C. et al. Population-based incidence and prevalence of systemic lupus erythematosus: the Michigan Lupus Epidemiology and Surveillance program. **Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)**, v. 66, n. 2, p. 369–78, 2014.

TABARKIEWICZ, J. et al. The Role of IL-17 and Th17 Lymphocytes in Autoimmune Diseases. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 63, n. 6, p. 435–449, 2015.

TACKEY, E.; LIPSKY, P. E.; ILLEI, G. G. Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 13, n. 5, p. 339–43, 2004.

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

TARGOŃSKA-STĘPNIAK, B.; MAJDAN, M. Associations between parameters of nutritional status and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v. 121, n. 4, p. 122–8, 2011.

TEDESCHI, S. K.; BERMAS, B.; COSTENBADER, K. H. Sexual disparities in the incidence and course of SLE and RA. **Clinical Immunology (Orlando, Fla.)**, v. 149, n. 2, p. 211–8, 2013.

TERRIER, B. et al. Restoration of regulatory and effector T cell balance and B cell homeostasis in systemic lupus erythematosus patients through vitamin D supplementation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 14, n. 5, p. R221, 2012.

THEOFILOPOULOS, A. N. et al. The role of IFN-gamma in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. **Arthritis Research**, v. 3, n. 3, p. 136–41, 2001.

TIFFIN, N.; HODKINSON, B.; OKPECHI, I. Lupus in Africa: can we dispel the myths and face the challenges? **Lupus**, v. 23, n. 1, p. 102–11, 2014.

TIKLY, M.; NAVARRA, S. V. Lupus in the developing world--is it any different? **Best Practice & Research. Clinical Rheumatology**, v. 22, n. 4, p. 643–55, 2008.

TOKANO, Y. et al. Levels of IL-12 in the sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE)--relation to Th1- and Th2-derived cytokines. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 116, n. 1, p. 169–73, 1999.

TOMITA, Y. et al. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in the TNF

genes of patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 11, n. 5, p. 533–6, 1993.

TOUZOT, M. et al. IFN- α induces IL-10 production and tilt the balance between Th1 and Th17 in Behçet disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 5, p. 370–375, 2015.

TRIFUNOVIĆ, J. et al. Pathologic patterns of interleukin 10 expression--a review. **Biochemia Medica**, v. 25, n. 1, p. 36–48, 2015.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 133–146, 2003.

TSOKOS, G. C. Systemic Lupus Erythematosus. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 22, p. 2110–2121, 2011.

TUCCI, M. et al. Cytokine overproduction, T-cell activation, and defective T-regulatory functions promote nephritis in systemic lupus erythematosus. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2010, p. 457146, 2010.

VIALARD, J. F. et al. Th1 (IL-2, interferon-gamma (IFN-gamma)) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). **Clinical and Experimental Immunology**, v. 115, n. 1, p. 189–95, 1999.

VILAR, M. J. P.; 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.

VUKMANOVIC-STEJIC, M. et al. Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. **Blood**, v. 95, n. 1, p. 231–40, 2000.

WAHREN-HERLENIUS, M.; DÖRNER, T. Immunopathogenic mechanisms of systemic autoimmune disease. **The Lancet**, v. 382, n. 9894, p. 819–831, 2016.

WANG, J. B. et al. Role of IL-1 β , IL-6, IL-8 and IFN- γ in pathogenesis of central nervous system neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 9, p. 16658–16663, 2015.

YANG, J. et al. Co-Positivity for Anti-dsDNA, -Nucleosome and -Histone Antibodies in

Lupus Nephritis Is Indicative of High Serum Levels and Severe Nephropathy. **PloS One**, v. 10, n. 10, p. e0140441, 2015.

YANIV, G. et al. **A volcanic explosion of autoantibodies in systemic lupus erythematosus: A diversity of 180 different antibodies found in SLE patients** *Autoimmunity Reviews*, jan. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568997214002158>>. Acesso em: 7 maio. 2016

YAP, D. Y. H. et al. Cytokines and their roles in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: from basics to recent advances. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2010, p. 365083, 2010.

YAP, D. Y. H.; LAI, K. N. The role of cytokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus - from bench to bedside. **Nephrology (Carlton, Vic.)**, v. 18, n. 4, p. 243–55, 2013.

YAP, K. S.; MORAND, E. F. Vitamin D and systemic lupus erythematosus: continued evolution. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 18, n. 2, p. 242–9, 2015.

YIN, Y. et al. Normalization of CD4+ T cell metabolism reverses lupus. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 274, p. 274ra18-274ra18, 2015.

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

YU, C.; GERSHWIN, M. E.; CHANG, C. Diagnostic criteria for systemic lupus erythematosus: A critical review. **Journal of Autoimmunity**, v. 48–49, p. 10–13, 2014.

YU, K.-H. et al. Prevalence and incidence in patients with autoimmune rheumatic diseases: a nationwide population-based study in Taiwan. **Arthritis Care & Research**, v. 65, n. 2, p. 244–50, 2013.

ZHANG, J.; AI, R.; CHOW, F. The polymorphisms of HLA-DR and TNF B loci in northern Chinese Han nationality and susceptibility to systemic lupus erythematosus. **Chinese Medical Science Journal**, v. 12, n. 2, p. 107–110., 1997.

ZHOU, Y. et al. The elevated expression of Th17-related cytokines and receptors is associated with skin lesion severity in early systemic sclerosis. **Human Immunology**, v. 76, n. 1, p. 22–9, 2015.

ZUNDLER, S.; NEURATH, M. F. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 5, p. 559–68, 2015.

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO CEP/UEL

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

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

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



LONDRINA, 04 de Março de 2013

Assinador por:
Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
(Coordenador)

Endereço: AVENIDA ROBERT KOCH, 60

Bairro: VILA OPERÁRIA

UF: PR

Telefone: (43)3371-2490

Município: LONDRINA

CEP: 86.038-440

E-mail: csp268@uel.br

ANEXO 2 - Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index - SLEDAI
(Bombardier et al., 1992)

Entrar com o peso específico na coluna do Score do SLEDAI se a alteração estiver presente na visita ou nos últimos 10 dias antes

Fator de ponderação	SLEDAI SCORE	DESCRIÇÃO	DEFINIÇÃO
8		Convulsão	Instalação recente excluindo causa metabólica, infecciosa ou causada por drogas
8		Psicose	Alteração da função mental normal devido a alterações graves da percepção da realidade. Inclui alucinações, incoerência, associações livres, empobrecimento do conteúdo do pensamento, pensamento marcadamente ilógico, comportamento bizarro, desorganizado ou catatónico. Excluir uremia e causas farmacológicas/drogas
8		Síndrome órgão-cerebral	Função mental alterada com alteração da orientação, memória ou outra função intelectual com rápida instalação e flutuação dos achados clínicos incluindo obnubilação da consciência com diminuição da capacidade de concentração e incapacidade de manter a atenção ao ambiente envolvente, mais pelo menos duas das seguintes: distúrbios da percepção, discurso incoerente, insónia ou sonolência diurna, aumento ou decréscimo da actividade psicomotora. Excluir causa metabólica, infecciosa ou causada por drogas
8		Distúrbios visuais	Alterações da retina ligados ao LES, incluindo corpos coroideus, hemorragias retinianas, exsudado seroso ou hemorragia no coroide ou nevríte óptica. Excluir HTA ou causa infecciosa ou causada por drogas
8		Distúrbios nos pares cranianos	Instalação recente de neuropatia sensitiva ou motora atingindo os pares cranianos
8		Cefaleia lúpica	Cefaleia severa, persistente; pode ser tipo migranoso mas deve ser resistente à terapêutica narcótica
8		AVC	Instalação recente de AVC. Excluir arteriosclerose
8		Vasculite	Ulceração, gangrena, nódulos digitais dolorosos, infarto periungeoal, hemorragias sub-ungueais, ou biópsia ou angiograma compatíveis com vasculite
4		Artrite	Mais de duas articulações com dor e sinais inflamatórios

4		Miosite	Dor/fraqueza muscular proximal, associado com elevação da CK/aldolase ou eletromiografia ou biopsia compatível com miosite
4		Cilindros urinários	Cilindros de Eritrócitos ou de granulosos
4		Hematúria	> 5 células por campo. Excluir litíase, infecção ou outra causa
4		Proteinúria	> 0.5g/24h. Instalação recente ou aumento > 0.5g/24h
4		Piúria	> 5 leucocitos por campo. Excluir, infecção
2		Novo rash	Instalação recente ou recorrência de rash tipo inflamatório
2		Alopécia	Instalação recente ou recorrência de perda anormal difusa ou localizada de cabelo
2		Ulcerações nasais	Instalação recente ou recorrência de ulcerações nasais
2		Pleurisia	Dor torácica pleurítica com atrito pleural derrame ou espessamento pleural
2		Pericardite	Dor pericárdica mais pelo menos um dos seguintes: atrito, derrame, ou confirmação eletrocardiográfica ou por ecocardiograma
2		Hipocomplementémia	C3, C4 ou CH50 abaixo dos valores de referência do laboratório
2		Aumento do DNA	>25 % no ligando pelo ensaio de Farr ou acima dos valores de referência do laboratório
1		Trombocitopénia	<100.000 plaquetas/mm ³
1		Leucopénia	<3.000 leucocitos/mm ³ Excluir causas farmacológicas
1		Febre	>38° C excluir causa infecciosa
		SCORE SLEDAI TOTAL (1-105)	

APÊNDICE 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para grupo de pacientes)

“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,
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 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para grupo controle)**“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 3 - Questionário Controles

Dados demográficos		Nº do Controle:	
Nome			
Endereço			
Telefone			
Data de nascimento			
Faz uso de algum Medicamento?	Quais? Qual dosagem?		
Tem alguma Doença?			
Etnia	<input type="checkbox"/> Caucasiano <input type="checkbox"/> Negro <input type="checkbox"/> Mulato <input type="checkbox"/> Asiático		
Cor da pele	<input type="checkbox"/> Branca <input type="checkbox"/> Negra <input type="checkbox"/> Pardo <input type="checkbox"/> Amarela		
Exposição solar diária	<input type="checkbox"/> Não se expõe ao sol diariamente <input type="checkbox"/> Baixa exposição (≤ 20 min/dia) <input type="checkbox"/> Exposição solar adequada (> 20 min/dia)		
Usa protetor solar?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Qual a frequência?		
Tabagismo	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Consumo de álcool	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Profissão			
Hábitos de dieta	<input type="checkbox"/> Suplementação alimentar <input type="checkbox"/> Antioxidante <input type="checkbox"/> Vitaminas <input type="checkbox"/> Dieta específica		
	Obs.:		
Dados Clínicos			
IMC:	Peso:	Altura:	Circunferência:
Pressão Arterial:	Atividade física?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Quantas vezes?	
Teve Inflamação/ Infecção na última semana?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Qual?	
Pós Menopausa	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Data última menstruação:	