



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LORENA FLOR DA ROSA FRANCHI SANTOS

**AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR
COMO PREDITORES DO DIAGNÓSTICO E ATIVIDADE DA
DOENÇA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO**

Londrina
2016

LORENA FLOR DA ROSA FRANCHI SANTOS

**AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR
COMO PREDITORES DO DIAGNÓSTICO E ATIVIDADE DA
DOENÇA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção de título de Mestre.

Orientador: Profa. 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

Santos, Lorena Flor da Rosa Franchi.

AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR COMO PREDITORES DO DIAGNÓSTICO E ATIVIDADE DA DOENÇA EM PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO / Lorena Flor da Rosa Franchi Santos. - Londrina, 2016. 90 f.

Orientador: Andréa Name Colado Simão.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Lúpus Eritematoso Sistêmico - Tese. 2. Moléculas de adesão celular - Tese. 3. Síndrome metabólica - Tese. 4. Modelos preditores - Tese. I. Simão, Andréa Name Colado. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

LORENA FLOR DA ROSA FRANCHI SANTOS

**AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR COMO
PREDITORES DO DIAGNÓSTICO E ATIVIDADE DA DOENÇA EM
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção de título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

Londrina, 27 de outubro de 2016.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo que Ele é e por toda sua obra realizada em minha vida. À Ele toda a glória.

Ao meu marido pelo incondicional apoio e compreensão, pelo companheirismo, incentivo e amor dedicado em todo tempo.

À minha família pelos ensinamentos, valores e princípios, pela compreensão, força e estímulo durante todo período de desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão, pela grande oportunidade que me foi confiada, pela experiência acadêmica transmitida e pela preciosa orientação prestada.

Ao Prof. Dr. Isaias Dichi e Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy pela participação nesta banca, pelas valiosas contribuições que foram feitas neste trabalho, pelas orientações, incentivo, paciência e dedicação.

Às Profas. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche e Dra. Elaine Delicato pelo grande conhecimento e contribuições na pesquisa.

Aos funcionários do laboratório de Imunologia que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Aos pacientes que participaram deste estudo pela disposição e colaboração.

À Universidade Estadual de Londrina, em especial ao programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, que possibilitou meu crescimento pessoal e profissional.

Aos colegas do laboratório de Pós-Graduação, pela ajuda e pelo compartilhamento de conhecimento.

À Bruna Miglioranza, Daniela Frizon Alfieri, Nicole Perugini Stadtlober e Tamires Flauzino pela fundamental participação neste trabalho.

Às minhas amigas Daniela, Tamires, Nicole, Bruna, Naiara, Lígia, Brunna e Luana pelo compartilhamento de idéias, pela excelente convivência, momentos de lazer e descontração, companheirismo e amizade.

Por fim, à todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SANTOS, Lorena Flor da Rosa Franchi. **Avaliação de moléculas de adesão celular como preditores do diagnóstico e atividade da doença em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico**. 2016. 89f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

RESUMO

Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune sistêmica caracterizada pela produção de autoanticorpos e inflamação crônica. Alguns estudos mostraram que moléculas de adesão estão aumentadas e podem estar correlacionadas com a atividade da doença e as manifestações clínicas em pacientes com LES. O objetivo do presente estudo foi avaliar alterações em moléculas de adesão no lúpus eritematoso sistêmico (LES) e avaliar se cortisol, títulos de anticorpos antinucleares (ANA) e síndrome metabólica (SM) estão associados com moléculas de adesão no LES. 48 indivíduos saudáveis e 171 pacientes com LES foram selecionados. A atividade da doença foi determinada pelo escore SLEDAI (Índice de atividade da doença LES). Foram avaliados os níveis de moléculas de adesão e cortisol. Molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1), molécula de adesão celular vascular (VCAM-1), E-selectina, P-selectina, e o inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) foram significativamente maiores em pacientes com LES ($p < 0.001$). Estas diferenças significativas não foram influenciadas pelo tratamento medicamentoso. Micofenolato diminuiu significativamente a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) ($p = 0.045$) e aumentou os níveis de E-selectina ($p = 0.012$). A análise de regressão logística binária mostrou que PECAM-1 e PAI-1 previram LES com sensibilidade de 86.5% e especificidade de 81.3%. ANA foi significativamente e positivamente associado com PECAM-1 ($p = 0.001$), VCAM-1 ($p = 0.001$), E-selectina ($p = 0.003$), e o PAI-1 ($p = 0.024$), enquanto que cortisol foi associado negativamente com PECAM-1 ($p = 0.017$) e ICAM-1 ($p = 0.045$). Houve associação significativa entre SM e E-selectina ($p < 0.001$), e o PAI-1 ($p = 0.027$). 18.2% da variação no escore SLEDAI foi explicada por aumento nos níveis de PECAM e títulos de DNA e presença de SM. Nossos dados confirmam que as moléculas de adesão desempenham papel na fisiopatologia do LES e mostram que o aumento dos níveis de moléculas de adesão, especialmente PECAM-1, pode ser utilizado como critério de validação externa para o diagnóstico de LES. SM, ANA e cortisol modulam as concentrações de moléculas de adesão, mas não explicam seus níveis aumentados no LES. Aumento dos níveis de moléculas de adesão pode ser considerado novo alvo terapêutico no LES.

Palavras-chave: Lúpus eritematoso sistêmico. Moléculas de adesão. Índice de massa corporal. Síndrome metabólica. Cortisol. Ana. Biomarcadores. Modelos preditores.

SANTOS, Lorena Flor da Rosa Franchi. **Cell adhesion molecules evaluation as predictors of diagnosis and disease activity in patients with Systemic Lupus Erythematosus**. 2016. 89p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, Londrina. 2016.

ABSTRACT

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease characterized by the production of autoantibodies and chronic inflammation. Some studies have shown that the adhesion molecules are increased and may correlate with disease activity and clinical manifestations in patients with SLE. The aim of the present study was to assess disorders in adhesion molecules in systemic lupus erythematosus (SLE) and to assess whether cortisol, nuclear autoantibody (ANA) titers and the metabolic syndrome (MetS) are associated with adhesion molecules in SLE. 48 healthy individuals and 171 SLE patients were enrolled. Disease activity was determined by SLEDAI (SLE Disease Activity Index) score. Adhesion molecules and cortisol levels were evaluated. Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), E-selectin, P-selectin, and plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) were significantly higher in SLE patients ($p < 0.001$). These significant differences were not influenced by drug treatment. Mycophenolate treatment significantly decreased intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) ($p = 0.045$) and increased E-selectin ($p = 0.012$) levels. Binary logistic regression analysis showed that PECAM-1 and PAI-1 predicted SLE with a sensitivity of 86.5% and a specificity of 81.3%. ANA was significantly and positively associated with PECAM-1 ($p = 0.001$), VCAM-1 ($p = 0.001$), E-selectin ($p = 0.003$), and PAI-1 ($p = 0.024$), whereas cortisol was negatively associated with PECAM-1 ($p = 0.017$) and ICAM-1 ($p = 0.045$). There were significant associations between MetS and E-selectin ($p < 0.001$), and PAI-1 ($p = 0.027$). 18.2% of the variance in SLEDAI score was explained by increased PECAM-1 values and DNA titers and the MetS. Our data confirm that adhesion molecules play a role in the pathophysiology of SLE and show that increased adhesion molecule levels, especially PECAM-1, can be used as an external validating criterion for the diagnosis SLE. MetS, ANA, and cortisol modulate the adhesion molecule concentrations but do not explain their increased levels in SLE. Increased levels of adhesion molecules must be considered a new drug target in SLE.

Keywords: Systemic lupus erythematosus. Adhesion molecules. Body mass index. Metabolic syndrome. Cortisol. Ana. Biomarkers, predictive models.

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Variáveis Sociodemográficas e biomarcadores em pacientes com Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) e controles saudáveis.....	60
Tabela 2 -	Resultados de análises de Modelo Linear Geral multivariado (GLM) com as moléculas de adesão como variáveis dependentes e diagnóstico, sexo, etnia, idade e índice de massa corporal (IMC) como variáveis explanatórias.....	61
Tabela 3 -	Valores de média marginal estimada das 6 moléculas de adesão obtidas pelas análises de Modelo Linear Geral multivariado (GLM) mostradas na tabela 2 (com etnia, sexo, idade, IMC e síndrome metabólica como covariáveis.....	62
Tabela 4 -	Resultados de análises de regressão logística binária com LES como variável dependente (e controle como grupo referência), moléculas de adesão e síndrome metabólica como variáveis explanatórias.....	63
Tabela 5 -	Resultados de (<i>stepwise</i> automático) análises de regressão univariada com o escore SLEDAI como variável independente.....	64
Tabela 6 -	Resultados de análises de Modelo Linear Geral multivariado (GLM) com as moléculas de adesão como variáveis dependentes e anticorpos antinucleares (ANA), títulos de ácido desóxirribonucleico (DNA) e cortisol plasmático como variáveis explanatórias.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Anticorpo antinuclear
Anti-DNA	Anticorpo anti-ácido desoxirribonucleico
Anti-dsDNA	Anticorpo anti-ácido desoxirribonucleico dupla fita
Anti-RNA	Anticorpo anti-ácido ribonucleico
CA	Circunferência abdominal
CALDAG-GEFI	GEFI cálcio e DAG-regulados
CAR	Colégio Americano de Reumatologia
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CRAC	Canal de cálcio ativado pela liberação de cálcio
DAG	Diacilglicerol
DCV	Doença Cardiovascular
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DOCK2	<i>“Dedicator of cytokinesis 2”</i>
ECLAM	European Consensus Lupus Activity Measure
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESAM	Molécula de adesão celular endotelial seletiva
ELISA	Enzimaimunoensaio
ENAS	Anticorpos contra antígenos nucleares extraíveis
ERM	Proteínas ezrina, radixina e moesina
ESL-1	Ligante de E-selectina tipo 1
GEF	Fator de troca de nucleotídeo de guanina
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GTPase	Enzima trifosfato guanosina hidrolase
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HTLV	Vírus linfotrópico de células T humanas
ICAM-1	Molécula de adesão celular intercelular 1
IFI	Imunofluorescência indireta
INF- α	Interferon do tipo alfa

INF- γ	Interferon gama
IgSF	Superfamília das Imunoglobulinas
IL-12	Interleucina 12
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
InsP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
JAM-A	Molécula de adesão juncional A
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LFA-1	Molécula associada a função leucocitária tipo 1
MAC	Molécula de Adesão Celular
MAC-1	Antígeno macrofágico tipo 1
MADCAM-1	Molécula de adesão celular vascular mucosa
MAPK	Proteino-quinase ativada por mitógenos
NCAM	Molécula de adesão celular neural
NF κ -B	Fator de Nuclear k-B
NL	Nefrite Lúpica
oxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PAD	Pressão arterial diastólica
PAI-1	Inibidor do Ativador do Plasminogênio
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Proteína C Reativa
PECAM-1	Molécula de adesão celular endotelial plaquetária 1
PI3K	Fosfaditilinositol-3-quinase
PLC	Fosfolipase C
PSGL-1	Glicoproteína ligante da P-selectina tipo 1
PtdIns(4,5)P ₂	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
RAC	Substrato <i>botulinum</i> C3-RAS relacionado
RAP1	Proteína RAS-relacionada
RAPL	Regulador de adesão celular e polarização
RHO	RAS-homóloga
RHOA	Membro familiar A do gene homólogo RAS

RIAM	Molécula adaptadora da interação RAP1-GTP
RNA	Ácido ribonucleico
SAAF	Síndrome do Anticorpo Antifosfolípide
SLEDAI	Índice de atividade da doença Lúpus Eritematoso Sistêmica
SM	Síndrome Metabólica
SNC	Sistema Nervoso Central
TLR	Receptores Toll-like
TNF- α	Fator de necrose tumoral do tipo alfa
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VE-caderina	Caderina vascular endotelial
VLA	Antígenos “ <i>Very Late</i> ”
VLA-4	Antígeno “ <i>Very Late</i> ” tipo 4
VVO	Organelas vesiculo-vacuolares

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	12
1.1.1	Manifestações Clínicas	13
1.1.2	Dados Epidemiológicos	14
1.2	MOLÉCULAS DE ADESÃO	15
1.2.1	Definição e Importância.....	15
1.2.2	Classificação	16
1.2.3	Fisiopatologia das Moléculas de Adesão na Inflamação	19
1.3	LES E MOLÉCULAS DE ADESÃO.....	24
1.4	LES, ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E MOLÉCULAS DE ADESÃO	26
1.5	INIBIDOR DO ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO TIPO 1 (PAI-1).....	31
2	JUSTIFICATIVA	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	35
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	35
4.2	DELINEAMENTO	35
4.3	MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS E DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL	35
4.4	Exames Laboratoriais.....	36
4.4.1	Marcadores Bioquímicos	36
4.4.2	Marcadores Imunológicos.....	36
4.4.3	Moléculas de Adesão	37
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5	RESULTADOS	38
5.1	ARTIGO	39

6	CONCLUSÃO	66
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
8	REFERÊNCIAS	68
	APÊNDICES E ANEXOS	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lúpus Eritematoso Sistêmico

Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune sistêmica caracterizada pela produção de autoanticorpos, formação e deposição de complexos imunes, inflamação em vários órgãos e dano tecidual (DIAMOND et al., 2011; KHATOON et al., 2012). A fisiopatologia do LES é complexa, mas complexos imunes, autoanticorpos e o complemento favorecem a inflamação e/ou destruição de órgãos e tecidos (AHMADPOOR; DALILI; ROSTAMI, 2014). A disfunção orgânica no LES varia de leve a grave, e pode oferecer risco orgânico ou à vida. O curso e apresentação do LES é imprevisível e variável, e é caracterizada por períodos de exacerbação da doença e remissão (BERTSIAS et al., 2008).

LES é uma doença multifatorial com evidência de envolvimento genético, além de fatores ambientais, hormonais e distúrbios na imunidade inata e adaptativa (LISNEVSKAIA; MURPHY; ISENBERG, 2014). Anormalidade imune típica no LES resulta da habilidade de produzir autoanticorpos patogênicos, da regulação debilitada de linfócitos B e T, e do clearance defeituoso de autoantígenos e da formação de complexos imunes (YASUTOMO, 2003).

Fatores ambientais como infecção viral, dieta, exposição à radiação ultravioleta, e exposição química ou a drogas, assim como hormônios sexuais e envelhecimento podem impactar epigenomicamente diferentes subgrupos de células humanas que, assim, interagem com variantes genéticas de risco em um indivíduo geneticamente predisposto. Essa complexa interação pode finalmente conduzir a quebra de tolerância própria do sistema imune, e então causar os diversos fenótipos clínicos de doenças autoimunes (LONG et al., 2016).

Hormônios sexuais têm demonstrado interagir com o sistema imune, incluindo células B e T, células dendríticas e redes de citocinas. Hormônios sexuais femininos parecem causar aumento da reatividade autoimune e contribuir para a perturbação imunológica que resulta em LES. Esses hormônios podem influenciar a sobrevivência de células B autorreativas, enquanto hormônios masculinos produzem efeitos opostos (GRYGIEL-GÓRNIAK; PUSZCZEWICZ, 2014).

No LES, o clearance de células apoptóticas por macrófagos mostra-se defeituoso, o que pode permitir que restos apoptóticos funcionem como imunógenos para a indução de células B e T autorreativas e produção de autoanticorpos (HERRMANN et al., 1998). Células apoptóticas podem ser reconhecidas por sua interação com diversas moléculas via fosfatidilserina. A interação da fosfatidilserina com diferentes receptores expressos em células apresentadoras de

antígenos promovem a supressão da sinalização de quimiocinas, expressão de receptores Toll-like (TLR), e indução de resposta tolerogênica frente a antígenos em células T virgens. Adicionalmente, DNase-1 atua como sistema de backup secundário para manter DNA fora do alcance da detecção imune. A deficiência ou diminuição da atividade de DNase-1 também leva a autoimunidade (AHMADPOOR; DALILI; ROSTAMI, 2014).

Vários anticorpos contra estruturas nucleares estão envolvidos na fisiopatologia do LES, tal como o anticorpo anti-cadeia dupla de DNA (anti-dsDNA) e os anticorpos contra antígenos nucleares extraíveis (ENAS). Anticorpos anti-DNA dupla fita (anti-dsDNA) são os autoanticorpos relacionados aos lúpus mais estudados (FU et al., 2015) e juntamente com anticorpos antinucleossomo estão envolvidas na atividade da doença e nefrite lúpica (NL) (CARVALHO; BÉRTOLO; LANNA, 2014). Os anticorpos contra ENAS (anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-Smith (anti-Sm) e anti-ribonucleoprotease (anti-RNP)) estão envolvidos no aparecimento de manifestações clínicas específicas e com a gravidade da doença. A presença destes autoanticorpos gera lesões locais e sistêmicas, podendo afetar pele, articulações, rins, pulmões e o sistema nervoso central (URAMOTO et al., 1999).

1.1.1. Manifestações Clínicas

O LES pode manifestar-se em diferentes sistemas orgânicos incluindo a pele e articulações, e em casos mais graves com envolvimento renal e do sistema nervoso central. Esses diferentes fenótipos estão associados a diferentes perfis de autoanticorpos, sendo que o anticorpo anti-dsDNA é encontrado principalmente em pacientes com glomerulonefrite. Outros autoanticorpos como anti-Ro, anti-La e fator reumatoide são observados em manifestações mais leves enquanto anticorpos antifosfolípidos são associados com risco aumentado de trombose e acidente vascular encefálico (BENGTSSON; RÖNNBLÖM, 2016).

Algumas manifestações clínicas características do LES apresentam-se fortemente correlacionadas ao aparecimento de autoanticorpos específicos, como nas manifestações cutâneas (anti-Ro), NL (anti-dsDNA e antinucleossomo), lúpus neonatal (anti-Ro e anti-La), e psicose lúpica (anti-pRibossomal), entretanto, alguns desses fenótipos ainda não apresentam associação científica e clinicamente comprovada (COZZANI et al., 2014).

Achados dermatológicos são encontrados na maioria dos pacientes lúpicos e constituem sinal precoce da doença. As lesões específicas podem ser agrupadas em agudas, subagudas e crônicas, e são classificadas de acordo com a histologia e duração da lesão, anormalidades laboratoriais e características clínicas. As manifestações cutâneas não específicas incluem

telangiectasias periungueais, fenômeno de Raynaud e eritema multiforme (HEJAZI; WERTH, 2016).

As principais manifestações hematológicas do LES são anemia, leucopenia, trombocitopenia e síndrome do anticorpo antifosfolípide (SAAF). A maioria dessas manifestações são causadas pelo aumento da destruição periférica de células sanguíneas pela presença de autoanticorpos circulantes. A medula óssea também pode ser alvo do LES e apresentar mielofibrose e anemia aplástica (VELO-GARCÍA; CASTRO; ISENBERG, 2016).

O envolvimento neuropsiquiátrico também pode ocorrer no LES e está associado a amplo espectro de apresentações clínicas. As manifestações podem envolver alterações do sistema nervoso central (SNC) como estado confusional agudo, psicose, ansiedade e desordens depressivas incluindo disfunção cognitiva. Além disso, também podem ocorrer síndromes focais do SNC com convulsões, doença cerebrovascular, mielopatia, mielite transversa, síndrome desmielinizante, meningite asséptica e enxaqueca (MIKDASHI, 2016).

Nefrite Lúpica é uma importante manifestação do LES, na qual ocorre a deposição precoce de complexos imunes no parênquima renal, normalmente formados por anticorpos anti-dsDNA e antinucleossomo. O consenso geral é de que 60% dos pacientes com a doença autoimune irão desenvolver uma ou mais formas relevantes de alterações renais ao longo do curso da doença (KANAPATHIPPILLAI et al., 2013; LALWANI et al., 2015).

1.1.2. Dados Epidemiológicos

Pons-Estel e colaboradores (2010) realizaram metanálise epidemiológica e observaram que a incidência do LES é variável em diferentes partes do mundo e diferentes faixas etárias, sendo estimada em 1-10 casos a cada 100.000 pessoas por ano com prevalência de 20-70 a cada 100.000 (PONS-ESTEL et al., 2010). A incidência e prevalência de LES parece estar aumentando provavelmente devido ao diagnóstico de casos leves e do aumento da sobrevivência desses pacientes (D'CRUZ; KHAMASHTA; HUGHES, 2007).

LES é aproximadamente 10 vezes mais frequente em mulheres usualmente em idade fértil (PONS-ESTEL et al., 2010), mas em algumas partes do mundo como Reino Unido e Suécia, o número de novos casos diagnosticados em mulheres com idade superior aos 45 anos tem sido alto (SOMERS et al., 2007; STÅHL-HALLENGREN et al., 2000). Essa predominância feminina é menos marcante nas populações jovens e de idosos com taxas de 2-6:1 e 3-8:1, respectivamente. Essa diferença é possivelmente atribuída ao efeito de hormônios

sexuais femininos sobre aspectos do sistema imunológico (RENAU; ISENBERG, 2012) como já comentado anteriormente.

Grupos étnicos, tais como aqueles com ascendência Africana ou asiática apresentam maior risco de desenvolver a doença, podendo ainda ser mais grave do que em pacientes caucasianos (D'CRUZ; KHAMASHTA; HUGHES, 2007). Assim, dados de incidência e prevalência de LES são substancialmente maiores em afro-americanos e afro-caribenhos, enquanto evidências consistentes sugerem doença mais grave em crianças, com aumento significativo do risco de NL e maior mortalidade quando comparado a pacientes adultos que desenvolvem doença (LISNEVSKAIA; MURPHY; ISENBERG, 2014).

No Brasil, dados epidemiológicos ainda são escassos, entretanto, estudo realizado na cidade de Natal-RN revelou incidência de 8,7 por 100.000 por ano (VILAR; RODRIGUES; SATO, 2003). Outro estudo realizado na cidade de Cascavel-PR demonstrou incidência de 4,8 por 100.000 por ano (NAKASHIMA et al., 2011). A diferença encontrada entre os estudos pode ser explicada pela maior incidência de luz solar na cidade de Natal devido a sua posição geográfica na região Nordeste do país, e também pela maior porcentagem de herança étnica e indivíduos negros se comparados com a população de Cascavel (NAKASHIMA et al., 2011).

1.2. Moléculas de Adesão

1.2.1. Definição e Importância

A proliferação, migração e diferenciação celular são processos fundamentais na formação de órgãos e tecidos e são modulados pela interação célula-célula e com seu microambiente (célula-matriz extracelular) por meio de moléculas de adesão celular (MACs) (WONG; DYE; COOMBE, 2012). MACs são proteínas integrais de membrana e compreendem domínios extracelular, transmembrana e citoplasmático. Essas moléculas podem se ligar a elas mesmas numa interação denominada homofílica, ou a superfície de outras moléculas (interação heterofílica), ou ambas. Podem ainda mediar a adesão entre duas células do mesmo tipo (adesão homotípica) ou de diferentes tipos (adesão heterotípica) (MCGARY; LEV; BAR-ELI, 2002). Elas também podem ser classificadas quanto à sua dependência de Ca^{2+} , sendo as caderinas, selectinas e integrinas moléculas dependentes de Ca^{2+} , enquanto que a superfamília das Imunoglobulinas (IgSF) não necessita da presença desse cátion (FREEMONT; HOYLAND, 1996).

MACs são expressas na superfície de células endoteliais e/ou de leucócitos e são essenciais para o desenvolvimento e manutenção da integridade da arquitetura tecidual em adultos. Essas moléculas desempenham importante papel em diversos processos biológicos incluindo organogênese, homeostasia tecidual e cicatrização (SKEOCH et al., 2014). MACs funcionam ainda como moléculas sinalizadoras e têm participação essencial na regulação da inflamação e resposta imune. São responsáveis pela adesão intercelular, recrutamento e migração seletiva de células inflamatórias dos vasos sanguíneos até o local da inflamação (GOMES; MACÊDO NETO; BISPO, 2009). Essas moléculas são liberadas na circulação e atuam como marcadores de ativação e disfunção endotelial, sendo reguladas positivamente por citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 beta (IL-1 β) (SKEOCH et al., 2014) e detectadas em sua forma solúvel no soro humano e em outros fluidos corporais obtidas por meio de clivagem proteolítica (HIRATA et al., 2015).

A adesão celular é resultado da múltipla ligação de diferentes moléculas de adesão com seus ligantes específicos e envolve a intercomunicação e cooperação entre diferentes moléculas de adesão, cada uma ligando-se a seus respectivos ligantes com diferentes afinidades. O evento da adesão celular varia de ligações muito estáveis a transitórias (CHEN; GUMBINER, 2006).

1.2.2. Classificação

Existem quatro principais tipos de moléculas de adesão: integrinas, membros da IgSF, selectinas e caderinas.

Integrinas

As integrinas são glicoproteínas transmembrana heterodiméricas, compostas por cadeias α e β ligadas entre si por ligações dissulfeto que compreendem um domínio extracelular, um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática. Elas são secretadas por células epiteliais e são expressas em leucócitos. As integrinas podem ser divididas em dois subgrupos principais. O subgrupo β 1 ou VLA (Antígeno “*very late*”) engloba a maioria dos membros da classe. Já o subgrupo das β 2 integrinas é representado pelo receptor de linfócito LFA-1 (Molécula associada a função leucocitária tipo 1) e pelo Mac-1 (Antígeno macrofágico tipo 1) (PAN et al., 2016).

Os principais ligantes das integrinas envolvem os membros da IgSF. As integrinas precisam ser primeiramente ativadas para que se liguem a seus receptores específicos e

componentes da matriz extracelular. Na inflamação, o complemento é ativado seguido pela ativação de macrófagos para produção de citocinas como IL-1 β e TNF- α provavelmente de maneira mediada por $\alpha 4\beta 1$ integrina (GOLIAS et al., 2011; SPRINGER, 1990).

Superfamília das Imunoglobulinas (IgSF)

Os membros da IgSF são amplamente expressas em células endoteliais e tem sua estrutura caracterizada por repetidos domínios similares aqueles encontrados nas imunoglobulinas (GOLIAS et al., 2011). Em imunoglobulinas há dois tipos de domínios denominados V e C. O domínio V ou variável apresenta propriedades de ligação a antígenos enquanto o domínio C é responsável por funções efetoras. O fragmento de ligação ao antígeno denominado Fab é formado por duas cadeias β antiparalelas ligadas entre si por uma ligação dissulfeto (BARCLAY, 2003).

Os membros dessa família que apresentam relevância para doenças vasculares incluem as moléculas de adesão celular intercelular 1 e 2 (ICAM-1 e ICAM-2), molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), molécula de adesão celular endotelial plaquetária 1 (PECAM-1) e molécula de adesão celular vascular mucosa (MADCAM-1). Outras representantes são molécula de adesão celular neural (NCAM) e antígeno carcinoembrionário (CEA) (ARICESCU; JONES, 2007). Os membros da IgSF são responsáveis pela firme adesão de leucócitos durante o processo de migração leucocitária e apresentam expressão aumentada em processos inflamatórios imunológicos crônicos (GOLIAS et al., 2011; KLEIN et al., 1998; ZIMMERMAN; PRESCOTT; MCINTYRE, 1992).

ICAM-1 (CD54) é uma glicoproteína transmembrana de 90 kDa e pode ser detectada tanto como proteína transmembrana quanto na sua forma solúvel (GOLIAS et al., 2011). É expressa em células endoteliais e epiteliais, em linfócitos, monócitos, eosinófilos, queratinócitos, células dendríticas, células hematopoiéticas ancestrais, fibroblastos e hepatócitos (GEARING et al., 1992). Níveis séricos aumentados de ICAM-1 são relatados em diferentes condições inflamatórias, entre elas as doenças autoimunes, casos de encefalite e outros tipos de desordens imunológicas do sistema nervoso central (RAO et al., 2007).

VCAM-1 ou CD106 é uma glicoproteína de 90 kDa que exhibe baixa expressão em células endoteliais não estimuladas e pode ser profundamente regulada positivamente após o estímulo por meio de citocinas pró-inflamatórias (GOLIAS et al., 2011). VCAM-1 é expressa na superfície de células endoteliais ativadas, fibroblastos, macrófagos teciduais e células

dendríticas. Dados de literatura tem relacionado ICAM-1 e VCAM-1 com doenças glomerulares (SKEOCH et al., 2014).

PECAM-1, também conhecida como CD31, apresenta peso molecular de 120 kDa e constitui uma glicoproteína expressa constitutivamente nas plaquetas, monócitos e neutrófilos, além de alguns tipos de células T e nas junções intercelulares de células endoteliais. PECAM-1 pode mediar a adesão por meio de interações homofílicas ligando-se a si mesma, ou interações heterofílicas ligando-se a integrina e é a molécula fundamental para a migração de leucócitos através do endotélio vascular via junções intercelulares (MULLER, 2003). PECAM-1 facilita a transmigração de leucócitos para locais de lesão e inflamação, e o bloqueio dessa MAC tem demonstrado eficácia em desordens inflamatórias (PRIVRATSKY; NEWMAN; NEWMAN, 2010). O caráter proinflamatório da atividade de PECAM-1 envolve principalmente a etapa final do recrutamento de leucócitos ao favorecer a abertura das junções endoteliais (HUANG et al., 1993), e promover a migração de leucócitos mediada por quimiocinas que direciona os leucócitos por meio da ativação de integrinas até o local da inflamação (PRIVRATSKY; NEWMAN; NEWMAN, 2010). Esse mecanismo poderia explicar o envolvimento de PECAM-1 com o diagnóstico e prognóstico de doenças inflamatórias.

Selectinas

Selectinas são glicoproteínas transmembrana que compartilham propriedades similares às lectinas e são expressas em células endoteliais (P e E-selectina), plaquetas (P-selectina) ou leucócitos (L-selectina) (HE et al., 2006). Essas moléculas compartilham uma estrutura comum incluindo um domínio N-terminal dependente de cálcio e mediam a interação inicial de baixa afinidade dos leucócitos com a célula endotelial durante a migração leucocitária (LEWIS; D'CRUZ, 2005).

Selectinas reagem com carboidratos que possuem um antígeno denominado sialil-Lewis X (sLex) e estas ligações são consideradas instáveis, permitindo o rolamento de leucócitos sobre o endotélio na direção do fluxo sanguíneo (BARTHEL et al., 2007; LEWIS; D'CRUZ, 2005). Níveis elevados de formas circulantes solúveis das selectinas foram relatados no soro de animais e pacientes com doenças inflamatórias (GEARING; NEWMAN, 1993; SKEOCH et al., 2014).

A P-selectina ou CD62P tem peso molecular de 140 kDa e é armazenada em grânulos específicos que estão presentes nas plaquetas (α -grânulos) e células endoteliais (corpos de Weibel-Palade) a partir de onde ela pode ser rapidamente mobilizada para a superfície da célula

em resposta a uma variedade de agentes inflamatórios tais como trombina, histamina, proteínas do complemento, citocinas e radicais livres (VAN GILS; ZWAGINGA; HORDIJK, 2009). Sua expressão na superfície celular geralmente apresenta meia vida curta, e, portanto, torna-se uma molécula ideal para as interações iniciais entre leucócitos e células endoteliais. O ligante da P-selectina é denominado glicoproteína ligante da P-selectina tipo 1 (PSGL-1) (GOLIAS et al., 2011). Há evidências em modelo animal que suportam o papel do gene dessa selectina na glomerulonefrite autoimune (MORRIS et al., 2009).

A E-selectina é amplamente expressa em locais de inflamação na vasculatura e pode funcionar como receptor de “*homing*” tecido-específico para subgrupos de células T. Seus principais ligantes são ligante de E-selectina tipo 1 (ESL-1) e PSGL-1 (TEDDER et al., 1995). Ela é encontrada em vasos cutâneos da pele inflamada (GOLIAS et al., 2011).

A L-selectina (CD26L) é uma proteína com peso molecular de 74 kDa que é expressa constitutivamente por leucócitos principalmente em neutrófilos, monócitos, eosinófilos e linfócitos (GOLIAS et al., 2011). L-selectina media a ligação de leucócitos ao endotélio ativado em locais de inflamação participando do início do processo de adesão (MCMURRAY, 1996).

Caderinas

As caderinas são moléculas de adesão celular dependentes de cálcio. Intracelularmente, elas unem-se a um grupo de moléculas conhecidas como cateninas que ligam o domínio citoplasmático da caderina a filamentos intermediários do citoesqueleto. Um importante representante desse grupo é a E-caderina, cuja expressão é regulada pelo protooncogene ErbB2, e é uma das primeiras moléculas de adesão a ser expressa durante o desenvolvimento embrionário. E-caderinas são importantes componentes dos desmossomos e se concentram em junções intercelulares conhecidas como zona de aderência (FREEMONT; HOYLAND, 1996).

1.2.3. Fisiopatologia das moléculas de adesão na inflamação

Os leucócitos são as principais células sanguíneas envolvidas na resposta inflamatória, sendo os neutrófilos as células predominantes nas primeiras 6 a 24 horas durante inflamações agudas. As principais alterações desse fenômeno envolvem vasodilatação, edema e recrutamento de leucócitos. Após a lesão inicial, ocorre aumento da permeabilidade endotelial e estase, o que contribui para a adesão e migração de leucócitos para os locais de inflamação ativado por meio de mediadores inflamatórios circulantes (FRANCISCHETTI et al., 2010). O

recrutamento de leucócitos para o local da inflamação envolve uma série de interações sequenciais com as células endoteliais, inicialmente, por meio da ligação de baixa afinidade do leucócito e seu rolamento ao longo da superfície da célula endotelial através das selectinas e seus ligantes. Em seguida, os leucócitos permanecem firmemente ligados ao endotélio através da ligação das integrinas dos leucócitos aos seus ligantes da IgSF no endotélio. Finalmente, ocorre a transmigração leucocitária por meio de moléculas que facilitam esse movimento como PECAM-1 e caderinas (**Figura 1**) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

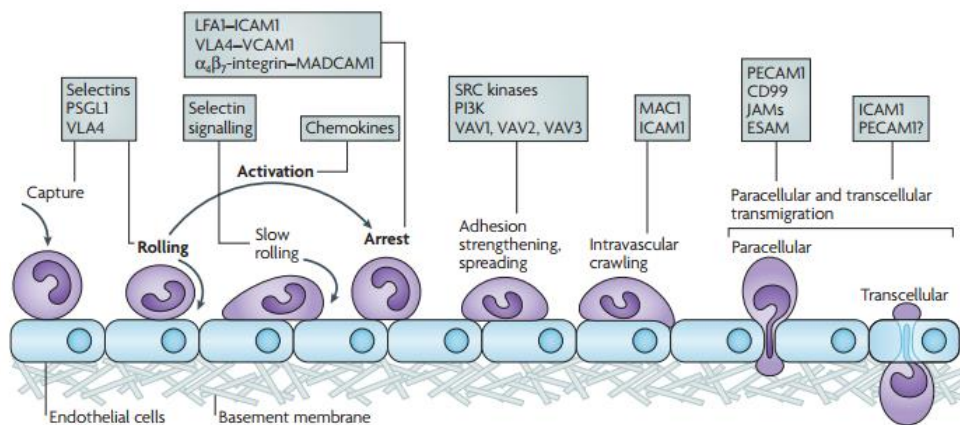


Figura 1 Cascata de adesão leucocitária.

Fonte: LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. (2007) Getting to the site of inflammation : the leukocyte adhesion cascade updated. Nature, v. 7, p. 678–689.

A primeira etapa da cascata de adesão leucocitária ocorre por meio da interação de selectinas com seus ligantes e consequente adesão dos leucócitos ao endotélio inflamado com taxas excepcionalmente altas de ligação e desligamento. Dessa forma, o endotélio tem papel fundamental na adesão de leucócitos pois expressa E e P-selectinas, as principais moléculas de captura e rolamento (ALON; HAMMER; SPRINGER, 1995; PURI et al., 2005). A L-selectina é expressa pela maioria dos leucócitos, enquanto E-selectina e P-selectina são expressas por células epiteliais inflamadas. A P-selectina é também expressa por plaquetas ativadas (ERIKSSON et al., 2001; SPERANDIO et al., 2003).

A segunda etapa envolve o rolamento de leucócitos. Nesse momento, as integrinas participam e promovem a firme adesão de leucócitos. Linhagens celulares que expressam $\alpha_4\beta_7$ -integrina rolam sobre MADCAM-1 no endotélio ativado, e linfócitos podem rolar sobre VCAM-1 pela ligação ao seu ligante de superfície antígeno “*very late*” tipo 4 (VLA-4, também

conhecido como $\alpha_4\beta_1$ -integrina) (BERLIN et al., 1995). Adicionalmente, uma fase de rolamento lento se estabelece. A ligação de E-selectina induz conformação de afinidade intermediária de LFA-1, também conhecido como $\alpha_L\beta_2$ -integrina, que se liga ao ICAM-1 endotelial de maneira transitória. Assim, o rolamento de leucócitos humanos parece estar aumentado e lentificado quando ICAM-1 é coexpresso com ligantes L-selectina (CHESNUTT et al., 2006; KADONO et al., 2002; SALAS et al., 2004).

Em seguida, ocorre a fase de ativação das integrinas e adesão estável. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm estabelecido que a adesão estável de leucócitos durante o rolamento é desencadeada por quimiocinas e moléculas quimioatraentes e é mediada pela ligação de integrinas leucocitárias a membros da IgSF, como ICAM-1 e VCAM-1, expressos pelas células endoteliais. A modulação da afinidade de integrinas por seus ligantes específicos é amplamente reconhecida como etapa crucial para adesão estável induzida por quimiocinas (LEY et al., 2007).

Durante a inflamação, células endoteliais são ativadas por citocinas inflamatórias a expressar moléculas de adesão e sintetizar quimiocinas e quimioatraentes lipídicos que são apresentados em sua superfície luminal. Essas quimiocinas se ligam com alta afinidade a receptores acoplados a proteína G (GPCRs) específicos (MIDDLETON et al., 1997). Uma vez ligado, a subunidade $\beta\gamma$ proteína G da GPCR ativa a fosfolipase C (PLC), que cliva o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂) a produzir inositol-1,4,5-trifosfato (InsP₃) e diacilglicerol (DAG). InsP₃ promove influxo de Ca²⁺ do retículo endoplasmático e do espaço extracelular pelo canal CRAC (canal de cálcio ativado pela liberação de cálcio). Ca²⁺ ativa a calmodulina e pode desencadear a ativação de GEFs (Fatores de troca de nucleotídeo de guanina) e GTPases. Finalmente, proteínas ligadas as integrinas ativam integrinas propriamente ditas. Esse processo é referido como sinalização “*inside-out*” e provavelmente contribui para a estabilização da adesão e motilidade celular (**Figura 2**) (LEY et al., 2007).

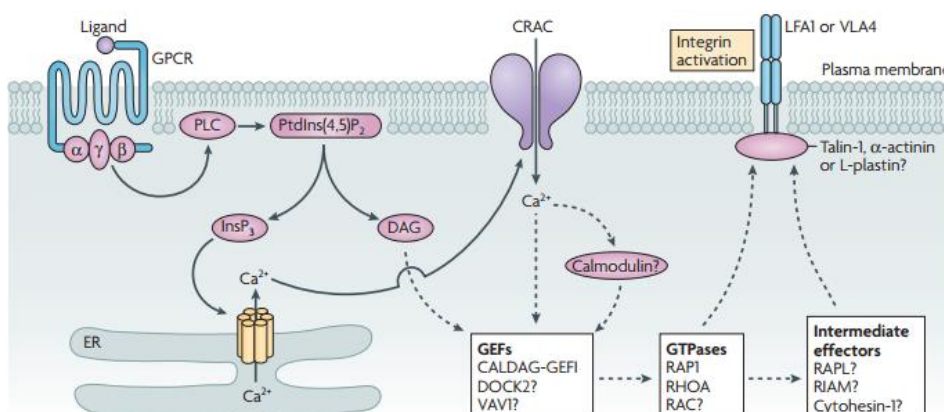


Figura 2 Ativação de integrinas dependente de GPCRs.

Fonte: LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. (2007) Getting to the site of inflammation : the leukocyte adhesion cascade updated. Nature, v. 7, p. 678–689.

Integrinas também se comportam como receptores de sinalização tradicional ao transmitir informações para o interior das células pela sinalização denominada “*outside-in*”. A ligação de integrinas aos seus ligantes extracelulares muda a conformação dessas moléculas e, devido a ligantes multivalentes, também contribui para o agrupamento de integrinas (SHATTIL; KIM; GINSBERG, 2010). A combinação desses dois eventos promove sinais intracelulares que controlam a polaridade celular, estrutura do citoesqueleto, expressão genética, sobrevivência e proliferação celular. Embora esses dois termos sejam conceitualmente separados, eles estão estreita e frequentemente relacionados, por exemplo, a ativação de integrinas pode aumentar a ligação de ligantes resultando em sinalização “*outside-in*”. Reciprocamente, a ligação de ligantes pode gerar sinais que causam sinalização “*inside-out*” (Figura 3) (SHATTIL; KIM; GINSBERG, 2010).

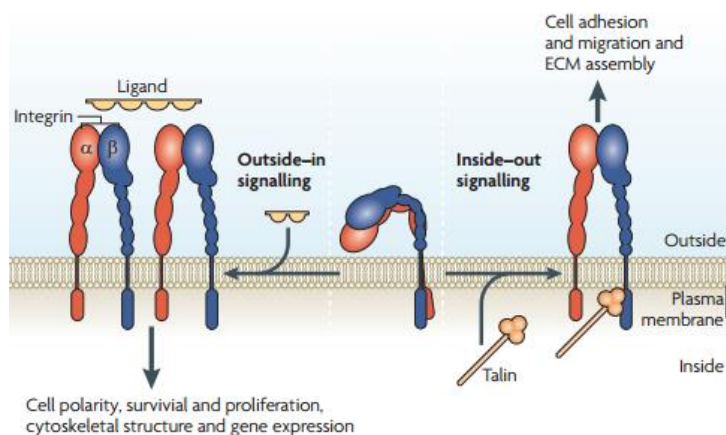


Figura 3 Sinalização Bidirecional das Integrinas.

Fonte: SHATTIL, S. J.; KIM, C.; GINSBERG, M. H. (2010) The final steps of integrin activation : the end game. Nature, v. 11, p. 288–300.

Finalmente, ocorrem as fases de rastejamento intracelular e transmigração. A migração de leucócitos através das paredes venulares envolve três barreiras distintas: células endoteliais, membrana basal de células endoteliais e perócitos (célula tipo mesenquimal, associada às

paredes de vasos sanguíneos pequenos que serve como suporte para estes vasos). A extensão das protuberâncias de membrana de leucócitos no corpo de células epiteliais e suas junções é desencadeado pela ligação entre ICAM-1 e MAC-1. Essa ligação está associada ao aumento intracelular de Ca^{2+} e ativação de quinases e GTPases, que coletivamente podem ativar outras quinases promovendo aumento da contração endotelial e, então, abertura de contatos interendoteliais (LEY et al., 2007).

A partir daí a migração pode evoluir através de duas rotas: paracelular ou transcelular. A migração paracelular envolve a liberação da caderina vascular endotelial (VE-caderina) e é facilitada por compartimentos de membrana intracelulares contendo pool de PECAM-1 e possivelmente outras moléculas de junção da célula endotelial, como a molécula de adesão juncional A (JAM-A) (LEY et al., 2007). Já a migração transcelular ocorre em regiões delgadas do endotélio onde há menor distância para o leucócito migrar. A ligação de ICAM-1 a seus ligantes específicos conduz sua translocação para regiões ricas em actina e cavéolas. Cavéolas contendo ICAM-1 formam organelas vesiculo-vacuolares (VVOs) que formam um canal intracelular através do qual leucócitos podem migrar. As proteínas ezrina, radixina e moesina (ERM) podem atuar como ligantes entre ICAM-1 e proteínas do citoesqueleto (como actina e vimentina) a fim de promover sua localização ao redor do canal e proporcionar suporte estrutural para a célula sob estas condições (**Figura 4**) (LEY et al., 2007).

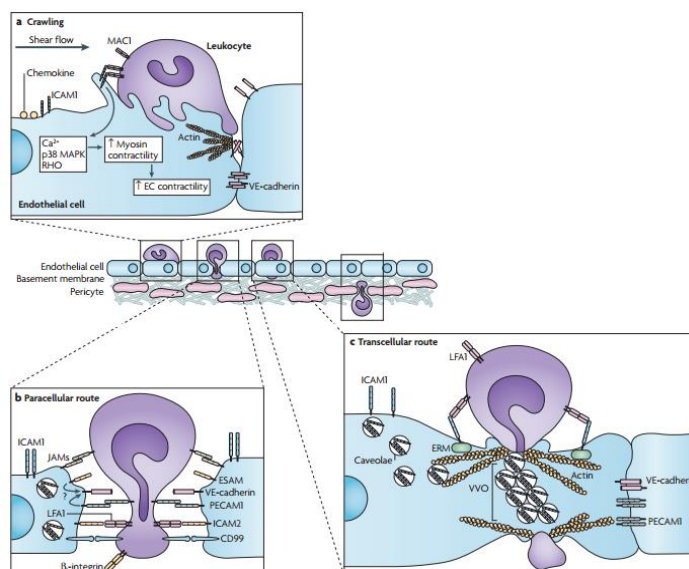


Figura 4 Transmigração de leucócitos.

Fonte: Adaptada de LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. (2007) Getting to the site of inflammation : the leukocyte adhesion cascade updated. Nature, v.

7, p. 678–689.

Após vencer a barreira endotelial, o leucócito migra através da membrana basal em regiões de baixa expressão de seus componentes proteicos (como a laminina vascular e colágeno tipo IV). Essas regiões de baixa expressão são colocalizadas com lacunas entre perócitos. Portanto, a migração de leucócitos ocorre especificamente nessas regiões de baixa resistência formadas por lacunas entre perócitos adjacentes e regiões de baixa deposição proteica dentro da matriz extracelular. Além disso, essas regiões de baixa expressão parecem ser mais permissivas a quimioatraentes gerados no tecido extravascular e, então, criar um gradiente quimiotático através dessas regiões (MIYASAKA; TANAKA, 2004; SIXT et al., 2001; WANG et al., 2006).

Diante da importância das MACs durante o processo inflamatório, ressalta-se ainda o fato de que essas moléculas podem afetar interações entre células T e células apresentadoras de antígeno, e entregar sinais necessários para a efetiva função de células T auxiliar, T citotóxica e células B (MOJCIK; SHEVACH, 1997). Assim, aberrações nesta função têm sido implicadas na patogênese de doenças autoimunes e alterações cardiovasculares relacionadas (FROSTEGÄRD, 2014; TURKCAPAR et al., 2005). MACs têm sido consideradas alvos terapêuticos para doenças autoimunes, embora nenhum medicamento tenha sido testado no LES até o momento (GIRALDO et al., 2012).

1.3. LES e Moléculas de adesão

Aberrações nas interações de adesão celular têm sido relatadas em pacientes com doenças reumáticas como LES, e estão frequentemente associadas com alterações vasculares precoces e infiltração celular nos tecidos alvos. Adicionalmente, os níveis de diversas moléculas de adesão aparecem elevados em pacientes lúpicos, tanto na circulação quanto no líquido cefalorraquidiano (HIRATA et al., 2015). Biópsias de pele e estudos *post-mortem* em pacientes com LES tem revelado aumento da expressão de VCAM-1 e ICAM-1 em células endoteliais e consequente indução da vasculopatia leucoclusiva (BELMONT et al., 1994; HANLY; WALSH; SANGALANG, 1992).

As concentrações séricas de VCAM-1 e ICAM-1 estão elevadas em pacientes com LES e podem se correlacionar com atividade da doença (FONT et al., 2000; JANSSEN et al., 1994; KLING et al., 1993). Outro estudo verificou ainda que a alteração nos níveis de VCAM-1 foi um marcador forte de resposta clínica medida pela redução na pontuação ECLAM (European

Consensus Lupus Activity Measure), em comparação com marcadores séricos convencionais da atividade da doença (LEWIS et al., 2016). Autor referiu que níveis elevados de L-selectina correlacionam com atividade clínica e concentrações do anticorpo anti-dsDNA no LES (FONT et al., 2000). Estudo evidenciou que níveis de VCAM-1 observados em pacientes com alta atividade do LES estão entre os mais altos níveis já encontrados dessa molécula com valores comparáveis aos pacientes em choque séptico (LEWIS et al., 2016; ZONNEVELD et al., 2014).

Em camundongos nocaute para ICAM-1, a deficiência de ICAM-1 foi associada com patologia dérmica reduzida. Já o bloqueio de VCAM-1 reduziu significativamente a adesão e rolamento de leucócitos na microcirculação cerebral. Portanto, ICAM-1 foi crítica para a adesão de leucócitos na pele, mas não no cérebro, onde VCAM-1 assume função principal (NORMAN; JAMES; HICKEY, 2008). Diversos estudos também demonstraram aumento relacionado com a idade na expressão de ICAM-1 e VCAM-1 em diferentes órgãos de camundongos MRL/lpr (MCHALE et al., 1999; ZAMEER; HOFFMAN, 2003).

Baraczka e colaboradores (2001) observaram que pacientes lúpicos com síndrome desmielinizante apresentaram níveis séricos e no líquido cefalorraquidiano elevados de VCAM-1 e ICAM-1 e aumento da síntese intratecal de L-selectina solúvel, o que sugere a presença intratecal do processo inflamatório. Assim, o envolvimento do SNC em processos imunológicos parece estar baseado em mudanças na permeabilidade do endotélio vascular (VCAM-1), seguida pela ativação de estruturas cerebrais (ICAM-1) e linfócitos (ICAM-1 e L-selectina) (BARACZKA et al., 2001).

VCAM-1 mostrou-se aumentada na nefrite ativa (SINGH et al., 2012), enquanto o aumento de E-selectina apareceu em pacientes com manifestações cutâneas (NYBERG; STEPHANSSON, 1999). Estudo coorte verificou que os níveis de VCAM-1 apresentaram associação significativa com NL ativa. Assim, essa molécula de adesão poderia ser uma alternativa não invasiva para o monitoramento da NL (SKEOCH et al., 2014).

Stielke e colaboradores (2012) encontraram que camundongos MRL/lpr que desenvolveram espontaneamente síndrome autoimune e glomerulonefrite proliferativa apresentaram regulação positiva de moléculas de adesão celular nos rins e cérebro. Alterações renais revelaram-se fortemente associados à patologia renal com aumento de E-selectina. Já o aumento de ICAM-1 e E-selectina apareceram até em cérebros normais dos camundongos. Assim, esses resultados indicam que uma regulação positiva de moléculas de adesão celular no cérebro precede a alterações neuropatológicas e está firmemente ligada a profundas alterações estruturais e funcionais nos rins (STIELKE et al., 2012).

Nakatani e colaboradores (2013) demonstraram que a expressão de E-selectina em pequenos vasos e glomérulos aumenta gradualmente durante o desenvolvimento da vasculite e NL em camundongos com modelo LES MRL/MPJ-lpr/lpr (MRL/lpr), e este aumento é acompanhado por infiltração significativa de células T e macrófagos nos glomérulos e regiões perivasculares (NAKATANI et al., 2013). Esses autores também mostraram que na NL proliferativa humana, os níveis renais de E-selectina estão significativamente associados com a infiltração renal por células T e macrófagos (NAKATANI et al., 2013).

Abd-Elkareem e colaboradores (2010) observaram que os níveis de VCAM-1 e ICAM-1 foram significativamente elevados em pacientes NL com danos renais avançado, e sugerem possível papel das moléculas de adesão no desenvolvimento de lesões renais, com ICAM-1 presente principalmente em células glomerulares e VCAM-1 nos túbulos distais e células intersticiais, endotelial glomerular, células epiteliais parietais, e espaços urinário (ABD-ELKAREEM et al., 2010). Assim, os autores propõem que níveis urinários significativamente elevados de moléculas de adesão em pacientes com NL e alterações histológicas avançadas podem refletir sua expressão renal e, portanto, a gravidade da nefrite e que a combinação da hipocomplementemia com aumento dos níveis urinários de moléculas de adesão parece ser útil como biomarcador da gravidade da doença em NL (ABD-ELKAREEM et al., 2010). Semelhantemente, paciente com LES e NL apresentaram níveis séricos elevados de ICAM-1, sendo estes níveis significativamente maiores naqueles pacientes hipertensos e com doença ativa, de forma que ICAM-1 pode servir como um marcador sorológico adicional de atividade da doença (SABRY et al., 2007).

Diversos trabalhos também ressaltam a importância das moléculas de adesão nas alterações cardiovasculares frequentemente observadas em pacientes com LES. VCAM-1 foi associada com distúrbios cardiovasculares em diversas doenças reumatológicas autoimunes, incluindo LES (BARTOLONI; SHOENFELD; GERLI, 2011; BRELAND et al., 2010).

1.4. LES, Alterações Cardiovasculares e Moléculas de adesão

A disfunção endotelial precede o desenvolvimento da aterosclerose e fundamenta o desenvolvimento de DCV. O processo é iniciado pelo acúmulo de macrófagos e lipoproteína de baixa densidade (LDL) que conduzem a ativação da resposta imune inata via TLR. A combinação desses receptores a padrões de reconhecimento molecular ativa a via do fator nuclear κ -B (NF κ -B), que media a expressão de moléculas de adesão, produção de citocinas e inflamação local associada. MACs e quimiocinas promovem o recrutamento de monócitos e

células T. Monócitos se diferenciam em macrófagos e aumentam a expressão de receptores de reconhecimento de padrões que internalizam lipoproteínas na camada íntima a fim de formar células espumosas e conseqüentemente a placa aterosclerótica. Células T, no local da injúria, reconhecem antígenos locais e montam resposta Th1 com secreção de citocinas próinflamatórias que contribuem para inflamação local e crescimento da placa. A ativação inflamatória prolongada, típica em condições autoimunes, pode levar a proteólise local, ruptura da placa e formação de trombos, que causam isquemia, infarto e comorbidades relacionadas (MILLER; CAPPuccio, 2007).

A progressão da DCV inclui, entre outros fatores, idade avançada e maior duração da doença reumatológica, o que suporta a hipótese de que a exposição crônica a desregulação imune no LES promove aterosclerose (ROMAN et al., 2007). Assim, apesar de seu mecanismo específico não estar completamente esclarecido, sabe-se que a inflamação crônica é denominador comum para o desenvolvimento da aterosclerose, pois ela pode resultar em recrutamento celular, regulação positiva das moléculas de adesão e liberação de citocinas próinflamatórias (BARTOLONI; SHOENFELD; GERLI, 2011; LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2010).

Manifestações cardiovasculares em doenças reumatológicas tem se tornado amplamente reconhecidas e podem ser a apresentação inicial dessas doenças. Essas manifestações podem revelar-se de maneira leve e clinicamente silenciosa, mas também podem aumentar a morbimortalidade dos pacientes. As principais estruturas afetadas são miocárdio, válvulas cardíacas, pericárdio, sistema condutor e vasculatura (PRASAD et al., 2015).

O risco de doença cardiovascular (DCV) no LES é alto e a prevalência de placas ateroscleróticas é elevada. Sabe-se que a aterosclerose pode desenvolver-se em 10% de pacientes lúpicos por ano (ROMAN et al., 2007). O aumento da incidência de DCV em pacientes com LES pode ser explicado por fatores de risco tradicionais que incluem hipertensão, dislipidemia, tabagismo e diabetes, e por fatores específicos da doença lúpica como atividade da doença, uso prolongado de corticosteroides, inflamação crônica, doença renal e outros. Apesar disso, a importância exata desses fatores no lúpus eritematoso sistêmico ainda não é clara (FROSTEGÄRD, 2014; KNIGHT; KAPLAN, 2013). Entretanto, sabe-se que a disfunção imune e endotelial é fundamental para a compreensão da aterosclerose acelerada no LES, condição comum em pacientes com doenças reumáticas submetidos a mecanismos inflamatórios e autoimunes que promovem a formação acelerada da placa vascular (BARTOLONI; SHOENFELD; GERLI, 2011).

A aterosclerose é um processo inflamatório complexo caracterizado por interações de componentes da imunidade inata e adaptativa, no qual o aumento do risco de aterosclerose observada no LES é provavelmente devido a interação complexa de muitos mediadores inflamatórios e imunes (MCMAHON; HAHN, 2007). As células T, principalmente do subtipo Th1, são abundantes em lesões ateroscleróticas, e podem desempenhar papel importante na formação da placa por meio da cascata de citocinas (Interferon- γ , TNF- α e IL-1, por exemplo) que é iniciada pela sua ativação (FROSTEGÄRD et al., 1999).

Citocinas proinflamatórias aumentam a expressão das moléculas de adesão que estimulam a proliferação de músculo liso, migram para a lesão e conduzem ao espessamento da parede do vaso e migração de monócitos. O processo aterosclerótico progride com acumulação de células mononucleares, proliferação de células musculares lisas e formação de tecido fibroso a fim de promover ampliação e remodelação da lesão (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2011). TNF- α também promove aterosclerose por atuação em diferentes níveis. Primeiramente, ele favorece o aumento da dislipidemia e resistência à insulina e induz estado protrombótico. TNF- α também está associado com ativação da cascata inflamatória com consequente regulação positiva de IL-1, interleucina 6 (IL-6), prostaglandinas e metaloproteases, que potencialmente promovem o estado inflamatório e aterosclerose acelerada (BARTOLONI; SHOENFELD; GERLI, 2011).

Autoanticorpos e complexos imunes também desempenham papel na patogênese da aterosclerose (MCMAHON; HAHN, 2007). Foi demonstrado que autoanticorpos contra lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL) são mais comuns em pacientes com LES que apresentam história de DCV do que nos pacientes LES sem histórico de DCV ou indivíduos controle saudáveis (SVENUNGSSON et al., 2001). Um estudo posterior, revelou relação dos títulos de anticorpos contra oxLDL com atividade da doença no LES (GÓMEZ-ZUMAQUERO et al., 2004). A sinalização via TLR parece regular a formação de anticorpos em doenças reumatológicas e participar do processo de aterosclerose. No LES, complexos imunes endógenos formados por anticorpos anti-dsDNA e anti-RNA ativam células dendríticas mediadas por TLR7 e TLR9 para liberar interferon do tipo alfa (INF- α). A liberação sistêmica dessa citocina promove ativação de macrófagos e células espumosas nas placas ateroscleróticas. Adicionalmente, células dendríticas presentes nessas placas podem ser ativadas pelo contato direto com complexos imunes contendo DNA/RNA, o que induz o recrutamento local e ativação de células inflamatórias, resultando em autoperpetuação do processo inflamatório e formação da placa (**Figura 5**) (HUANG; POPE, 2010).

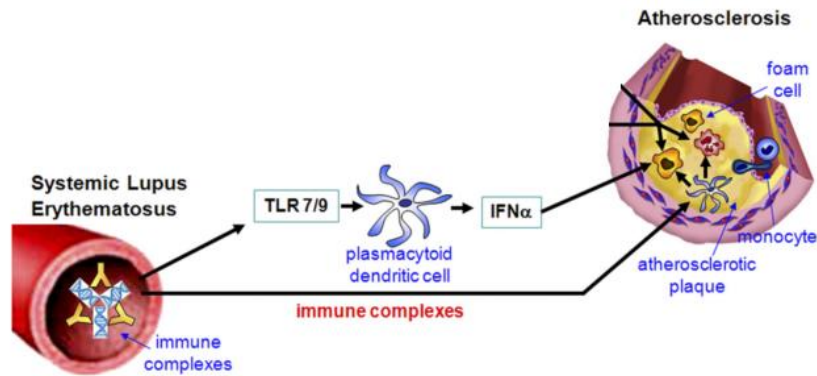


Figura 5 A conexão entre autoimunidade e aterosclerose.

Fonte: HUANG, Q.; POPE, R. M. (2010) Toll-like receptor signaling: a potential link among rheumatoid arthritis, systemic lupus, and atherosclerosis. *Journal of leukocyte biology*, v. 88, p. 253–262.

A síndrome metabólica (SM) constitui um conjunto de fatores de risco para DCV que inclui obesidade central, dislipidemia, hipertensão e alteração do metabolismo da glicose. A inflamação tem sido associada com ocorrência de SM, e no Brasil, sua prevalência varia entre 20 e 32% (FESTA et al., 2000; FORD; GILES; DIETZ, 2002; PARKER; BRUCE, 2010; TELLES et al., 2010). Um estudo prévio publicado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que pacientes com LES têm alta prevalência de SM o que contribui diretamente para aumento do estado inflamatório. Pacientes com LES e SM mostraram níveis elevados de proteína C reativa (PCR) sugerindo que o aumento da síntese de citocinas próinflamatórias gerado pela gordura abdominal poderia reforçar o processo inflamatório no LES. Além disso, encontrou-se uma correlação positiva entre o escore SLEDAI (Índice de atividade da doença Lúpus Eritematoso Sistêmica) e o índice de massa corporal (IMC) e a circunferência abdominal (LOZOVY et al., 2011). Um estudo posterior de nosso grupo demonstrou que pacientes com LES ativo têm maior probabilidade de desenvolver hipertensão do que indivíduos saudáveis e pacientes com LES inativo. Observou-se ainda associação da hipertensão com o perfil Th1/Th2 mostrado pelo aumento das proporções IL-12/IL-10, IFN- γ /IL-10, e IFN- γ /IL-4. Assim, esse estudo concluiu que a predominância da resposta Th1 e aumento do estresse oxidativo são fundamentais na fisiopatologia da hipertensão em LES ativo mesmo sem insuficiência renal (LOZOVY et al., 2014).

As moléculas de adesão também promovem aterosclerose através do recrutamento de leucócitos para o espaço subendotelial e constituem elementos fundamentais na aceleração da aterosclerose (LIBBY; RIDKER; HANSSON, 2010; MURDACA et al., 2012).

As moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1, E-selectina e a citocina TNF- α estão associados com a aterosclerose subclínica em pacientes com LES independente do escore de risco de Framingham o que fornece novos “*insights*” sobre mecanismos que podem contribuir para a aterosclerose acelerada associada com a inflamação (RHO et al., 2008). O escore de Framingham é uma fórmula de previsão na população em geral da probabilidade de doença coronariana e é calculado baseado nos resultados do “*Framingham Heart Study*”. De acordo com faixa etária, sexo, valores de pressão arterial sistólica, valores da razão entre o colesterol total e a fração HDL, presença de tabagismo e diagnóstico de diabetes é possível estabelecer o risco de infarto do miocárdio e angina (PATHAN; NEGISHI, 2016).

Moléculas de adesão solúveis também foram descritas como marcadores biohumorais da extensão e gravidade da aterosclerose (BLANKENBERG; BARBAUX; TIRET, 2003). Nawawi e colaboradores (2003) observaram que ICAM-1 é melhor preditor de eventos cardiovasculares futuros e que as concentrações séricas de VCAM-1 e ICAM-1 aumentaram moderadamente em doenças associadas com disfunção endotelial, evidência de que os níveis de ICAM-1 parecem refletir a disfunção endotelial sistêmica de maneira eficaz quando comparado a VCAM-1 (NAWAWI et al., 2003).

Batuca e colaboradores (2009) observaram que níveis aumentados de VCAM-1 correlacionam com baixos níveis de HDL e com atividade do LES, enquanto os níveis de ICAM-1 não refletiram atividade da doença (BATUCA et al., 2009). Esses resultados podem ser corroborados por estudos realizados na aorta de camundongos *Ldlr*^{-/-} que demonstraram que a deficiência de VCAM-1 diminuiu a formação precoce de células espumosas, sugerindo o papel crucial das moléculas de adesão, como VCAM-1, na iniciação da aterosclerose (CYBULSKY et al., 2001). Gustafsson e colaboradores (2012) encontraram que altos níveis circulantes de VCAM-1 estavam associados com a mortalidade cardiovascular em estudo coorte com pacientes lúpicos (GUSTAFSSON et al., 2012).

Skeoch e colaboradores (2014) realizaram de estudo coorte e verificaram níveis aumentados de E-selectina em pacientes com LES quando comparados ao grupo controle e que esse aumento foi independentemente associado com dano relacionado ao LES e com formação de placa de carótida. Também observaram associação dos níveis de E-selectina com marcadores de aterosclerose subclínica, talvez devido à ativação endotelial crônica que pode contribuir para a aterosclerose acelerada observada no LES (SKEOCH et al., 2014). Estudos têm sugerido que

a E-selectina pode ser o elo entre obesidade e comorbidades relacionadas (EL-MESALLAMY; HAMDY; IBRAHIM, 2011), além de ser um potencial marcador de risco cardiovascular em pacientes com LES (SKEOCH et al., 2014).

Pamuk e colaboradores (2014) descobriram associação de diferentes polimorfismos de PECAM-1 com LES e alguns deles parecem ser protetores contra complicações ateroscleróticas (PAMUK et al., 2014). Concentrações plasmáticas elevadas do inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) também foram documentados em numerosas desordens cardiovasculares, especialmente a aterosclerose (MASSOT et al., 2014; VAUGHAN, 2005).

1.5. Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1)

PAI-1 não é uma MAC, entretanto ele é o principal inibidor da fibrinólise e contribui para o aumento do risco cardiovascular em sobrepeso e indivíduos obesos, proporcionando informações complementares se avaliado juntamente com as MACs (KOHLENER; GRANT, 2000). Ele é uma proteína circulante sintetizada pelas plaquetas, hepatócitos, adipócitos, células musculares lisas vasculares e várias células epiteliais (HA; OH; LEE, 2009). Entretanto, o tecido adiposo abdominal é a maior fonte de PAI-1 (BARNARD; PIETERS; DE LANGE, 2016) e seu nível plasmático elevado é considerado marcador bioquímico da obesidade (PHELAN; KERINS, 2014), e também componente da SM (ALESSI; JUHAN-VAGUE, 2008).

O plasminogênio é ativado em plasmina que degrada a fibrina, num processo conhecido como fibrinólise (NICHOLL; ROZTOCIL; DAVIES, 2006). Durante a coagulação, a trombina provoca a liberação de PAI-1 a partir das plaquetas, o que evita a degradação do coágulo. Idealmente, PAI-1 é rigidamente controlado para equilibrar coagulação e fibrinólise (SAVOY; VAN LIESHOUT; STEINER, 2016). Níveis elevados de PAI-1 que levam a fibrinólise defeituosa desempenham um papel significativo na produção de estado de hipercoagulabilidade na SAAF primária e secundária (SINGH et al., 2013). Polimorfismo genéticos de PAI-1 têm sido propostos como risco adicional de desenvolvimento de trombose arterial na SAAF, além de se comportarem como preditores da alta atividade da NL (WANG et al., 2001).

Kwiecinski e colaboradores (2009) observaram níveis intratecais de PAI-1 aumentados em pacientes com LES Neuropsiquiátrico (LESNP) indicando que a fibrinólise intratecal pode estar prejudicada nesses pacientes. Além disso, demonstraram correlação significativa dos níveis de PAI-1 com níveis da proteína triplete de neurofilamentos e proteína ácida fibrilar glial, o que sugere potencial papel da liberação intratecal de PAI-1 na patogênese do dano neuronal e astrocitário em LESNP (KWIECINSKI et al., 2009).

Somers e colaboradores (2005) relataram relação inversa entre níveis circulantes de PAI-1 e função endotelial em mulheres com menos de 55 anos de idade com LES. Esta relação persistiu após o controle de vários potenciais fatores confundidores, incluindo a idade, IMC e atividade da doença lúpica (SOMERS et al., 2005). Desse modo, tem sido proposto que a regulação positiva da expressão de PAI-1 após a injúria arterial favorece o desenvolvimento da aterosclerose e que elevados níveis plasmáticos de PAI-1 estão associados com complicações da aterosclerose (FAY, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

Os dados descritos na literatura demonstram aumento nos níveis de moléculas de adesão em pacientes com a inflamação crônica e disfunção endotelial, entre eles pacientes lúpicos e com DCV. Ademais, diversos trabalhos sugerem o envolvimento de diferentes moléculas de adesão no aparecimento de diferentes manifestações clínicas características do LES. Entretanto, não é do nosso conhecimento, até o presente momento, estudos que tenham avaliado concomitantemente as moléculas de adesão em pacientes com LES e a influência que diferentes fatores, entre eles a presença de SM, níveis de cortisol e anticorpos antinucleares, podem exercer sobre os níveis séricos dessas moléculas. Diante deste cenário, ressalta-se a importância do estudo das moléculas de adesão como possíveis biomarcadores laboratoriais para o diagnóstico de LES e o monitoramento da sua atividade.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os níveis séricos de moléculas de adesão em pacientes com LES e sua associação com o diagnóstico e a atividade da doença.

3.2. Objetivos Específicos

- Comparar os níveis de moléculas de adesão em pacientes com LES e indivíduos saudáveis;
- Verificar o efeito do diagnóstico, sexo, idade, etnia, IMC, hipertensão, SM, níveis de cortisol, ANA, DNA e uso de medicamentos nos níveis séricos de moléculas de adesão em pacientes com LES e indivíduos saudáveis;
- Determinar quais moléculas de adesão estão associados a presença de LES;
- Propor um modelo de preditores para o diagnóstico de LES utilizando as moléculas de adesão e outros parâmetros associados a doença;
- Avaliar se as moléculas de adesão podem predizer o escore SLEDAI;
- Propor modelos de preditores para o escore SLEDAI utilizando as moléculas de adesão e outros parâmetros associados a doença.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (CAAE 01865212.0.0000.5231, Parecer CEP/UEL nº 205.328, Anexo 1). Os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido dos indivíduos envolvidos na pesquisa ou de seus responsáveis (Apêndice 1A e 1B).

4.2. Delineamento

Participaram deste estudo 219 indivíduos de ambos os sexos e com idade entre 18 e 69 anos, sendo 171 pacientes com LES selecionados do Ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário de Londrina, Paraná, Brasil e 48 indivíduos saudáveis selecionados entre doadores de sangue fidelizados do Hemocentro Regional de Londrina. No grupo controle, os critérios de exclusão foram presença de doenças crônicas infecciosas, doenças autoimunes, câncer, doenças cardíacas, renais crônicos e insuficiência hepática e utilização de terapia para reposição hormonal. Nos pacientes com LES, os critérios de exclusão foram presença de doenças crônicas infecciosas, câncer e outras doenças autoimunes, além da utilização de terapia para reposição hormonal. Informações referentes a estilo de vida e histórico médico foram obtidos a partir de avaliação clínica de cada paciente.

O diagnóstico do LES foi realizado a partir dos critérios revisados do Colégio Americano de Reumatologia (CAR) 1997 (HOCHBERG, 1997) e a atividade da doença foi determinada através da utilização do escore SLEDAI. O SLEDAI é um índice global que inclui 24 critérios clínicos e laboratoriais específicos, e a atividade da doença pode variar de 0 a 105 pontos (BOMBARDIER et al., 1992).

4.3. Medidas Antropométricas e Determinação da Pressão Arterial

O peso corporal foi avaliado com aproximação de 0,1 kg utilizando uma balança eletrônica e com os indivíduos vestindo roupas leves, sem sapatos e no período da manhã; a altura foi medida com precisão de 0,1 cm, utilizando-se um estadiômetro. O IMC foi calculado como peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado. A circunferência abdominal (CA) foi

medida com uma fita suave na região entre a última costela e a crista ilíaca, sempre com os indivíduos na posição em pé. Três medidas da pressão arterial foram registradas com intervalo de um minuto entre elas depois do indivíduo se sentar. A média destas medições foi utilizada na análise (PICKERING et al., 2005). A hipertensão foi considerada diagnosticada quando a pressão arterial foi $\geq 140/90$ mmHg ou quando os pacientes estavam em uso de medicação anti-hipertensiva.

4.4. Exames Laboratoriais

Após jejum de 12h, foram coletadas amostras em tubo de coleta a vácuo sem anticoagulante e com anticoagulante EDTA. O material foi encaminhado imediatamente ao laboratório para registro, processamento e armazenamento das amostras. Plasma e soro foram obtidos após centrifugação (10 min 2500 rpm) e armazenados em freezer -80°C até o momento das análises quando as amostras não eram analisadas no mesmo dia. Todos os pacientes e controles e suas respectivas amostras foram identificados por número e letra para garantir o anonimato e confidencialidade dos indivíduos e dos resultados obtidos.

4.4.1. Marcadores Bioquímicos

Os níveis de glicose, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e triglicerídeos foram determinados por autoanalisador bioquímico (Dimension Dade AR Dade Behring Deerfield, IL, EUA), utilizando kits Dade Behring®.

Síndrome Metabólica (SM) foi definida quando um indivíduo apresentou três ou mais das seguintes medidas: obesidade abdominal com circunferência abdominal ≥ 102 cm para homens, e ≥ 88 cm para mulheres; níveis de triglicerídeos ≥ 150 mg/dL; colesterol HDL menor que 40 mg/dL para homens e menor que 50 mg/dL para mulheres; glicose em jejum ≥ 100 mg/dL ou uso de hipoglicemiantes; e/ou PAS ≥ 130 mmHg e PAD ≥ 85 mmHg ou uso de anti-hipertensivos, de acordo com os critérios propostos pela “*American Heart Association*” (GRUNDY et al., 2005).

4.4.2. Marcadores Imunológicos

Os níveis de cortisol foram avaliados por imunoensaio em micropartícula com quimiluminescência (Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). A determinação

de ANA e dos títulos de anti-dsDNA foram realizadas por imunofluorescência indireta (IFI) (ANA-HEp 2, Viro-Immun-Labor-Diagnostika, GmbH, Oberursel, Germany; Nova Lite® ds-DNA *Crithidia luciliae*, Inova Diagnostics, GmbH, Saint Ingbert, Germany).

4.4.3. Moléculas de Adesão

Os níveis de PECAM-1, ICAM-1, VCAM-1, E-Selectina, P-Selectina, e o PAI-1 foram determinados pelo kit Human Magnetic Adhesion 6-Plex Panel (Novex Life Technologies, Frederick, United States of America) para plataforma Luminex®.

4.5. Análise Estatística

Análises de tabelas de contingência (X^2 -teste) foram utilizadas para examinar associações entre dois conjuntos de variáveis categóricas. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para verificar diferenças entre grupos em variáveis contínuas. Transformações logarítmicas foram usadas para normalizar a distribuição dos dados das moléculas de adesão. Análises de regressão logística binária (*stepwise* automático) foram empregadas para determinar as variáveis explanatórias significativas incluindo diagnóstico, síndrome metabólica, idade, sendo LES como variável dependente e controles como grupo referência. Utilizou-se análise multivariada modelo linear geral (GLM) para delinear os efeitos multivariados de variáveis explanatórias (por exemplo, diagnóstico, IMC, síndrome metabólica, idade, sexo) sobre as variáveis dependentes, incluindo as 6 moléculas de adesão. Testes de efeitos entre sujeitos foram posteriormente utilizados para verificar efeitos univariados das variáveis explanatórias estatisticamente significativas. Análises de regressão (*stepwise* automático) foram utilizadas para determinar variáveis explanatórias significativas, incluindo moléculas de adesão, ANA, títulos de DNA e SM prevendo SLEDAI. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o IBM SPSS para Windows, versão 22. Os testes foram bicaudais e nível alfa de 0,05 indicaram resultados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em um artigo científico intitulado: **“Increased Adhesion Molecule Levels in Systemic Lupus Erythematosus: Relationships with Severity of Illness, Autoimmunity, Metabolic Syndrome and Cortisol Levels”** e submetido à revista *Rheumatology*, com fator de impacto 4,524.

5.1. Artigo

Increased Adhesion Molecule Levels in Systemic Lupus Erythematosus: Relationships with Severity of Illness, Autoimmunity, Metabolic Syndrome and Cortisol Levels

Lupus: prediction models and adhesion molecules

Lorena Flor da Rosa Franchi Santos¹, Nicole Perugini Stadtlober¹, Ligia Grecco Costa Dall'Aqua¹, Bruna Miglioranza Scavuzzi², Poliana Macedo Guimarães², Tamires Flauzino², Marcell Alysson Batisti Lozovoy³, Tathiana Veiga Mayumi Iriyoda⁴, Edna Maria Vissoci Reiche³, Isaias Dichi⁵, Michael Maes⁶, Andréa Name Colado Simão³.

1. Graduate Program in Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – University of Londrina, Brazil.
2. Graduate Program in Health Sciences – University of Londrina, Brazil.
3. Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – University of Londrina, Brazil.
4. Department of Rheumatology – University of Londrina, Brazil.
5. Department of Internal Medicine – University of Londrina, Brazil.
6. IMPACT Strategic Research Centre, School of Medicine – Deakin University, Geelong, VIC, Australia.

* Corresponding author: Andréa Name Colado Simão.

Postal address: Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology – Rua 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

ABSTRACT

Objectives: To verify disorders in adhesion molecules in systemic lupus erythematosus (SLE) and to assess whether cortisol, nuclear autoantibody (ANA) titers and the metabolic syndrome (MetS) are associated with adhesion molecules in SLE.

Methods: 48 healthy individuals and 171 SLE patients were enrolled. Disease activity was determined by SLEDAI (SLE Disease Activity Index) score. Adhesion molecules and cortisol levels were evaluated.

Results: Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), E-selectin, P-selectin, and plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) were significantly higher in SLE patients. These significant differences were not influenced by drug treatment. Mycophenolate treatment significantly decreased intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and increased E-selectin levels. Binary logistic regression analysis showed that PECAM-1 and PAI-1 predicted SLE with a sensitivity of 86.5% and a specificity of 81.3%. ANA was significantly and positively associated with PECAM-1, VCAM-1, E-selectin, and PAI-1, whereas cortisol was negatively associated with PCAM-1 and ICAM-1. There were significant associations between MetS and E-selectin and PAI-1. 18.2% of the variance in SLEDAI score was explained by increased PECAM-1 values and DNA titers and the MetS.

Conclusions: Our data confirm that adhesion molecules play a role in the pathophysiology of SLE and show that increased adhesion molecule levels, especially PECAM-1, can be used as an external validating criterion for the diagnosis SLE. MetS, ANA, and cortisol modulate the adhesion molecule concentrations but do not explain their increased levels in SLE. Increased levels of adhesion molecules must be considered a new drug target in SLE.

Keywords: Systemic Lupus Erythematosus, adhesion molecules, body mass index, metabolic syndrome, cortisol, ANA, biomarkers, predictive models.

Introduction

Cell adhesion molecules (CAMs) enable leukocyte adhesion and rolling along endothelial cells surfaces and control migration of leukocytes into inflamed tissues. With the aid of chemokines and chemoattractants, these molecules facilitate leucocyte-endothelial cell interactions and the transmigration of inflammatory cells to sites of inflammation thereby acting as markers of endothelial activation and dysfunction [1]. Previous studies showed increased levels of adhesion molecules in systemic lupus erythematosus (SLE) patients [2]. Elevated adhesion molecules levels have also been associated with disease activity [3] and its characteristic phenotypes [4], including cutaneous manifestations [5], neurological disorders [6] and lupus nephritis (LN) [7]. Adhesion molecules have been studied as potential biomarkers for SLE with respect to its activity and clinical manifestations [8].

Aberrations in cell adhesive interactions have been reported in SLE, and these are often accompanied by vascular changes and cellular infiltration of tissues [9]. Multifactorial components are involved in the elevation of local expression as well as in levels of serum soluble adhesion molecules, however, chronic inflammation and endothelial dysfunction are key components [10,11]. Additionally, cortisol levels, nuclear autoantibody (ANA) and metabolic syndrome (MetS) could further influence adhesion molecules levels.

SLE patients have diminished hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness, causing a tendency towards lower cortisol levels. This relative hypoactivity may be a result of chronic inflammation, or it may be a premorbid dysfunction that is important in the etiology of rheumatic diseases [12]. Cortisol is associated with anti-inflammatory and immunosuppressive effects and it possibly inhibits IL-1, TNF- α , Th1-type responses (IFN- γ , IL-2) and induces a Th2-type immune response (cytokines IL-4, IL-10, and IL-13) [13]. In addition, cortisol could also be involved in the inhibition of the expression of adhesion molecules [14].

MetS is generally defined as a complex disorder represented by a combination of risk factors that lead to an increased coronary heart disease risk, other types of atherosclerotic cardiovascular diseases, and type two diabetes (T2D) [15]. Several components of MetS have been associated with endothelial dysfunction and increased adhesion molecules levels [16]. We previously reported that SLE patients have a high prevalence of MetS, which directly contributes to increased inflammatory potential. In addition, a correlation of SLE Disease Activity Index (SLEDAI) score with body mass index (BMI) and waist circumference was found [17].

SLE has been associated with accelerated atherosclerosis attributable to a combination of predisposing factors, including antiphospholipid antibodies, chronic glucocorticoid therapy, nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment, vitamin D deficiency and chronically elevated inflammatory markers [18]. SLE has been considered an independent risk factor for endothelial dysfunction, suggesting it is probably not associated with the occurrence of classic Framingham risk factors [19]. Endothelial activation precedes atherosclerosis, while circulating levels of adhesion molecules may be increased in SLE patients [18,20]. Several studies emphasize the importance of adhesion molecules in cardiovascular events frequently observed in patients with SLE [21,22].

Given the important role of the adhesion molecules in the pathophysiology of SLE and disease activity, it is crucial to elucidate the possible components that could modulate these levels and profiles, which would be associated with the pathophysiology of the disease. It is of large clinical interest to determine models of laboratory biomarkers that can predict the diagnosis of SLE and monitor disease activity. Thus, the aim of the present study was to evaluate adhesion molecules in SLE and disease activity, and how MetS, cortisol levels, and ANA could influence their levels. Finally, effective predictive models for the diagnosis of SLE and its activity were proposed.

Subjects and Methods

Subjects

The patients with SLE (171), of both sexes, aged from 18 to 69 years, were recruited at the Rheumatology Ambulatory of the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil to participate in this cross-sectional study. SLE was diagnosed using the American College of Rheumatology (ACR) criteria (1997)[23] and disease activity was determined using SLEDAI score. SLE patients were divided into two groups with inactive disease (SLEDAI < 6) and active disease (SLEDAI ≥ 6)[24]. The patients were paired by sex, age, ethnicity, BMI and smoking. The control group was constituted by 48 individuals selected among healthy blood donors. MetS was defined following the American Heart Association criteria [25].

Information about lifestyle and medical history were obtained at clinical evaluation. None of the participants in the study presented heart, thyroid, hepatic, gastrointestinal, oncological or other autoimmune diseases, and none had a clinically evident infection or was receiving estrogen replacement therapy. This clinical investigation was fully anonymized and all participants gave written informed consent that was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. The study protocol was fully approved by the Ethical Committee of the University of Londrina (Paraná, Brazil) (CAAE 01865212.0.0000.5231, CEP/UEL 205.328). All mandatory laboratory health and safety procedures have been complied.

Anthropometric measurements

Body weight was assessed to the nearest 0.1 kg using electronic scales with individuals wearing light clothing and no shoes. Body height was assessed to the nearest 0.1 cm by using a stadiometer. BMI was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. The waist

circumference was measured with a soft tape in the region between the last rib and the iliac crest, always in the standing position. Blood pressure $\geq 140/90$ mmHg or use of antihypertensive medications were the considered criteria to define hypertension [26].

Biochemical and Immunological biomarkers

After fasting for 12h, the patients underwent the following laboratory blood analysis: cortisol levels were evaluated by chemiluminescence microparticle immunoassay (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). ANAs and antibodies anti-double stranded DNA (anti-dsDNA) were quantified using indirect immunofluorescence with HEp2 cells as substrate (IFI-ANA-HEp 2-IgG, Viro-Immun-Labor-Diagnostika, GmbH, Oberursel, Germany and Nova Lite® ds DNA *Crithidia luciliae*, Inova Diagnostics, GmbH, Saint Ingbert, Germany, respectively) and were considered significant when titers $\geq 1:160$ e ≥ 20 IU/mL, respectively.

Adhesion Molecules and Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1)

Levels of platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), E-selectin, P-selectin, and PAI-1 were determined by Human Magnetic Adhesion 6-Plex Panel (Novex Life Technologies, Frederick, United States of America) for Luminex® platform.

Statistical Analysis

Analyses of variance (ANOVA) were used to check between-group differences in continuous variables. Analyses of contingency tables (X^2 -test) were used to examine the associations between two sets of categorical variables. Binary logistic regression analyses (automatic stepwise) were employed to determine the significant explanatory variables including diagnosis, the MetS, age, explaining SLE as dependent variable and controls as the

reference group. We used multivariate general linear model (GLM) analysis to delineate the multivariate effects of explanatory variables (e.g. diagnosis, BMI, the MetS, age, sex) on dependent variables, including the six adhesion molecules. Tests for between-subject effects were subsequently used to check the univariate effects of the statistically significant explanatory variables. We used (automatic stepwise) regression analyses to determine the significant explanatory variables, including adhesion molecules, ANA, DNA titers and the MetS predicting the SLEDAI. Ln transformations were used to normalize the data distribution of the adhesion molecules. 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.

Results

Table 1 shows the demographic, clinical and biological data in SLE patients versus controls. There were no significant differences in age and sex between the two study groups. BMI and waist circumference were significantly higher in SLE patients than in controls, while there were significantly more SLE patients with MetS than controls. There were significantly more non-Caucasians than Caucasians in the SLE study group. Therefore, we have adjusted our results for age, sex, BMI (or the MetS) and ethnicity. The SLEDAI score was significantly higher in SLE patients than controls. ANA and the DNA titers were significantly higher in patients than controls. Cortisol was significantly lower in SLE patients.

Table 2 shows the results of multivariate GLM analysis with the six adhesion molecules as dependent variables (all in Ln transformation) and diagnosis (SLE versus controls) as a primary explanatory variable while adjusting for other possible explanatory variables such as age, sex, ethnicity and BMI. We found that diagnosis, BMI, and age had significant multivariate effects on the adhesion molecules, while sex and ethnicity were not significant. Tests of between-subject effects showed that diagnosis was associated with all adhesion molecules,

except ICAM-1. **Table 3** shows the marginal mean values (with SE) of the adhesion molecules obtained after this GLM analysis in patients with SLE and controls. PECAM-1, VCAM-1, E-selectin, P-selectin, and PAI-1 were significantly higher in SLE patients than in controls. Age was significantly and positively related to VCAM-1 and P-selectin, while BMI was significantly and positively associated with E-selectin.

We have also adjusted our results for possible effects of drug treatments and hypertension by entering these variables as additional explanatory variables in the above multivariate GLM analysis. 95 of the SLE patients were treated with antimalarial medications, 55 with immunosuppressive, 20 with statins, 32 with mycophenolate, and 97 with prednisolone (5 mg – 60 mg). Table 2 shows that there were no significant effects of treatment with antimalarial medications, immunosuppressive, statins and prednisolone on the adhesion molecules, while the effects of SLE remained highly significant. We found a multivariate effect of mycophenolate on the adhesion molecules. Tests of between-subject effects showed a significant effect of mycophenolate treatment on ICAM-1 (decreased) and E-selectin (increased). Entering hypertension as an additional variable showed that there was no significant multivariate effect of hypertension on the adhesion molecules and that the effects of diagnosis remained significant.

We have also examined the effects of diagnosis and MetS (entered instead of BMI) on the adhesion molecules, while adjusting for age, sex and ethnicity. Table 2 shows that also MetS had a significant multivariate effect on the six adhesion molecules while the effects of SLE remained significant. Test of between-subject effects showed that MetS had significant effects on E-selectin and PAI-1 (all higher in subjects with the MetS).

Table 4 shows the results of logistic regression analyses with SLE as dependent variable and control as the reference group and the five significantly different adhesion molecules as explanatory variables. All five adhesion molecules were positively associated with SLE with

Nagelkerke values between 0.251 – 0.572. An automatic stepwise binary logistic regression analysis showed that two variables were positively and significantly associated with SLE, i.e. PECAM-1 and PAI-1. Using these two variables, 85.1% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 86.5% and a specificity of 81.3% (Nagelkerke = 0.642). Entry of MetS in the same analysis showed that the latter was significantly and positively associated with SLE while the effects of PECAM-1 and PAI-1 remained significant ($X^2=113.80$, $df=3$, $p<0.001$; 88.9% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 88.6% and a specificity of 89.6%; Nagelkerke = 0.699).

Table 5 shows the outcome of 5 different (automatic stepwise) regression analyses with the SLEDAI score as dependent variable and the six adhesion molecules (regression #1) with ANA (regression #2), DNA titers (regression #3) or with MetS (regression #4) as explanatory variables. Regression #1 (automatic stepwise) showed that 10.7% of the variance in the SLEDAI was explained by the regression on PECAM-1 (positively associated). Forced entry of ANA (regression #2) showed that PECAM-1 is more important in predicting the SLEDAI and that ANA is not significant in predicting SLE after considering the effects of PECAM-1. Introducing DNA titers in the analysis (regression #3) showed that PECAM-1 together with DNA titers explained 14.1% of the variance in the SLEDAI scores. Regression #4 reveals that PECAM-1 and MetS have significant effects on the SLEDAI. Regression #5 shows that 18.2% of the variance in the SLEDAI is explained by the regression on PECAM-1, DNA titers, and MetS.

Table 6 shows the associations between the adhesion molecules and other biomarkers of SLE, such as ANA, DNA titers, and cortisol levels. Multivariate GLM analysis #1 shows that ANA had a significant multivariate effect on the adhesion molecules. Between-subject effects revealed that ANA was significantly and positively associated with PECAM-1, VCAM-1, E-selectin, and PAI-1. GLM analysis #2 shows that there was no significant association

between the adhesion molecules and DNA titers. GLM analysis #3 indicates that cortisol was significantly and negatively associated with PECAM-1 and ICAM-1.

Discussion

We simultaneously analyzed adhesion molecules PECAM-1, ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin, P-Selectin, and PAI-1 levels in SLE patients to study their contributions for the prediction of SLE diagnosis and disease activity. Increased levels of all adhesion molecules, except ICAM-1, were significantly associated with SLE. Using PECAM-1 and PAI-1 levels (with or without the inclusion of the MetS) we were able to establish a model predicting increased risk towards SLE: these markers correctly classified SLE (sensitivity 88.6%) and healthy samples (specificity 89.6%). SLE was associated with higher PECAM-1, VCAM-1, E-Selectin, P-Selectin, and PAI-1 levels. Previous studies have reported an up-regulation of VCAM-1 [20,27], E-selectin [20,28], P-Selectin [20,27], and PAI-1 [29] in patients with SLE.

Our results show that BMI was positively associated with E-selectin and that MetS had significant effects on E-selectin, and PAI-1 levels. These findings are in agreement with several other studies that have consistently found associations between E-selectin, increased body weight, obesity, glucose and lipid metabolism and MetS [30–32]. Investigators have suggested that E-selectin levels may be regulated by the proinflammatory adipocytokine TNF- α and also by adiponectin, an adipocytokine with anti-inflammatory, anti-diabetogenic and anti-atherogenic properties. These adipocytokines would have the property to inhibit each other's production in adipose tissue [31,32]. Unlike E-selectin, which is associated with increased total fat volume, but not with regional fat distribution [31], abdominal fat is a great source of PAI-1 [33]. Thus, high plasma levels of this molecule are expected in lupus patients with MetS, since PAI-1 is considered an obesity biochemical marker, and central obesity is a component of MetS [34].

We found that attenuated cortisol levels were negatively associated with PECAM-1 and ICAM-1. Cortisol has important immunomodulatory actions, including exerting a negative feedback on proinflammatory cytokines and increasing IL-10 production, thereby having anti-inflammatory and negative immune-regulatory effects [35]. *Since cytokines induce adhesion molecules* on the vascular endothelium, the inverse association between cortisol and adhesion molecules was expected.

Aging contributes to endothelial dysfunction due to increased inflammation and oxidative stress [36]. As expected, age was positively related to VCAM-1 and P-selectin, and these findings corroborate those from Skeoch and colleagues (2014), who also found a positive association between age and adhesion molecules VCAM-1 and P-selectin [2].

PECAM-1 actively mediates leukocyte transendothelial migration and may mobilize to the luminal surface, thus creating an adhesive haptotactic gradient that guides luminal leukocytes to the junctions [37,38]. We found significant differences in serum levels of PECAM-1 in patients with SLE compared to control group and PECAM-1 was the most important adhesion molecule to predict SLEDAI.

In the present study, a significant effect of MetS on SLEDAI score was found, suggesting that improving metabolic health by modulating MetS components may be important in the treatment of active SLE.

Thus, a model predicting the SLEDAI score was established based on the levels of PECAM-1 and DNA titers and the MetS. Importantly, PECAM-1 was the most significant predictor variable, while ANA did not have a significant effect on the SLEDAI score after considering the strong effects of PECAM-1. The percentage of SLEDAI score predicted increased only marginally when DNA titers and MetS were introduced in the regressions. This shows that increased PECAM-1 was the most important biomarker for SLE diagnosis and severity of illness as well. The pro inflammatory activity of PECAM-1 mainly occurs at the

final stage of leukocyte recruitment, favoring endothelial junction dilation and promoting leukocyte migration mediated by chemokines, which lead the leukocytes through integrin activation to the inflammatory sites [39]. Muller and colleagues (2003) consider PECAM-1 as the essential molecule responsible for leukocyte migration through vascular endothelium via intercellular junction [37].

The present study also demonstrated that ANA was significantly and positively associated with PECAM-1, VCAM-1, E-selectin, and PAI-1. Anti-dsDNA is among the laboratory parameters included in the SLEDAI score and there is a substantial percentage of patients who are persistently negative for anti-dsDNA, thus halting proper monitoring of the disease activity [40]. Other studies have demonstrated a correlation between disease activity, anti-dsDNA, and other adhesion molecules. A correlation of VCAM-1 with SLEDAI and significant positive correlation with anti-dsDNA has been previously demonstrated [41]. These findings are consistent with the hypothesis that immune complex formation and upregulation of adhesion molecules are involved in SLE pathogenesis. Finally, the presence of MetS increased the predictive power of the model because this phenomenon may contribute directly to the inflammatory state in SLE [42].

Mycophenolate is known to induce apoptosis of antigen-activated T cell clones, reduce the production of antibodies to inhibit the expression of adhesion molecules and reduce the influx of leukocytes and monocytes to inflammatory sites [43]. Accordingly, we found a multivariate effect of mycophenolate on the adhesion molecules. In addition, different studies have independently shown that mycophenolate increases [44] or has no effect on ICAM-1 [45]. Nevertheless, we found decreased ICAM-1 levels. The decreased ICAM-1 levels after drug treatment may be explained by the inhibitory action of mycophenolate on adhesion molecule synthesis [46]. Decreased expression of ICAM-1 due to mycophenolate has been previously found in rodent models [46] and umbilical veins [47].

The present study also demonstrated increased levels of E-selectin caused by mycophenolate, but several studies suggested this medication may reduce the endothelial expression of E-selectin [45,48]. These findings could be supported by those of Hauser and colleagues (1997) who found elevated E-selectin expression after mycophenolate. The authors demonstrated that pretreatment of cultured endothelial cells (EC) with mycophenolate increases magnitude and duration of TNF α -induced expression of E-selectin, but not of ICAM-1 [49]. Transcription of E-selectin is induced and consequently increased when endothelial cells are exposed to inflammatory cytokines, such as interleukin-1 β (IL-1 β) or TNF- α and this increase appear to result from the increased stability of mRNAs encoding E-selectin [49].

To the best of our knowledge, this is the first *in vivo* human study to demonstrate that: (a) cortisol is inversely associated with PECAM-1 and ICAM-1; (b) PECAM-1 is associated with SLE disease activity as assessed using the SLEDAI; and (c) ANA was significantly and positively associated with PECAM-1, VCAM-1, E-selectin, and PAI-1. This study does not claim to replace useful conventional parameters in diagnosis and monitoring of lupus disease. However, these markers are not always sensitive or specific enough to detect ongoing disease activity and related clinical manifestations. Therefore, the aim of this study was to propose models to improve the SLE patient monitoring as well as to verify the precocious response to treatment.

In conclusion, our data demonstrated that increased levels of adhesion molecules are associated with SLE diagnosis and age, BMI, ANA, DNA titers, cortisol levels, MetS and use of mycophenolate could influence their concentration. We also propose a model predicting SLE diagnosis, based on PECAM-1 and PAI-1 and MetS and a model predicting the SLEDAI score, based on PECAM-1 and DNA titers and MetS. These results show that increased levels of adhesion molecules, especially PECAM-1, are a new drug target in SLE.

Acknowledgements

Funding: No other specific funding was received from any funding bodies in the public, commercial or not-for-profit sectors to carry out the work described in this article.

Disclosure statement: The authors have declared no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*. 1994;76:301–14.
2. Skeoch S, Haque S, Pemberton P, Bruce I. Cell adhesion molecules as potential biomarkers of nephritis, damage and accelerated atherosclerosis in patients with SLE. *Lupus* [Internet]. 2014;23:819–24. Available from: <http://lup.sagepub.com>
3. Lewis M, Vyse S, Shields A, Zou L, Khamashta M, Gordon P, et al. Improved monitoring of clinical response in Systemic Lupus Erythematosus by longitudinal trend in soluble vascular cell adhesion molecule-1. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2016;18(5):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13075-015-0896-7>
4. Bertias G, Cervera R, Boumpas DT. Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis and Clinical Features. *EULAR Textb Rheum Dis* [Internet]. 2012;476–505. Available from: <http://libweb.anglia.ac.uk/>
5. Hejazi EZ, Werth VP. Cutaneous Lupus Erythematosus: An Update on Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. *Am J Clin Dermatol* [Internet]. 2016;17(2):135–46. Available from: "<http://dx.doi.org/10.1007/s40257-016-0173-9>
6. Mikdashi JA. Altered functional neuronal activity in neuropsychiatric lupus: A systematic review of the fMRI investigations. *Semin Arthritis Rheum* [Internet]. 2016;45(4):455–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semarthrit.2015.08.002>
7. Lalwani P, Souza GKBB, Lima DSN, Passos LF, Boechat AL, Lima ES. Serum thiols

- as a biomarker of disease activity in lupus nephritis. *PLoS One*. 2015;10(3):1–12.
8. Soliman S, Mohan C. Lupus Nephritis Biomarkers. *Clin Immunol* [Internet]. 2016; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521661616302571>
 9. Hirata T, Usui T, Kobayashi S, Mimori T. Biochemical and Biophysical Research Communications A novel splice variant of human L-selectin encodes a soluble molecule that is elevated in serum of patients with rheumatic diseases. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2015;462:371–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.002>
 10. Prasad M, Hermann J, Gabriel SE, Weyand CM, Mulvagh S, Mankad R, et al. Cardiorheumatology: cardiac involvement in systemic rheumatic disease. *Nat Rev Cardiol*. 2015;12(3):168–76.
 11. Bartoloni E, Shoenfeld Y, Gerli R. Inflammatory and autoimmune mechanisms in the induction of atherosclerotic damage in systemic rheumatic diseases: Two faces of the same coin. *Arthritis Care Res*. 2011;63(2):178–83.
 12. Goes MC, Bossema ER, Hartkamp A, Guido LR, Jacobs JWG, Kruize AA, et al. Cortisol During the Day in Patients with Systemic Lupus Erythematosus or Primary Sjögren ' s Syndrome. *J Rheumatol*. 2011;38(2):285–8.
 13. Cutolo M, Sulli A, Villaggio B, Seriola B, Accardo S. Annals of the Rheumatic Diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1998;57:573–7.
 14. Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. [Internet]. Vol. 89, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992. p. 9991–5. Available from: <http://www.pnas.org/content/89/21/9991.abstract?ijkey=176c8d39c0b9a655c6b5d61ae>

e4f1cb4c1d71a1a&keytype2=tf_ipsecsha

15. Reaven GM. Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. 1988. *Nutrition*. 1997;13(1):65; discussion 64, 66.
16. Scharam MT, Stehouwer CDA. Endothelial Dysfunction, Cellular Adhesion Molecules and the Metabolic Syndrome. *Horm Metab Res*. 2005;37(Supplement 1):49–55.
17. Lozovoy MAB, Simao ANC, Hohmann MSN, Simao TNC, Barbosa DS, Morimoto HK, et al. Inflammatory biomarkers and oxidative stress measurements in patients with systemic lupus erythematosus with or without metabolic syndrome. *Lupus*. 2011;20:1356–64.
18. Mok CC, Poon WL, Lai JPS, Wong CK, Chiu SM, Lun SWM, et al. Metabolic syndrome, endothelial injury, and subclinical atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* [Internet]. 2010;39(1):42–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132070>
19. El-Magadmi M, Bodill H, Ahmad Y, Durrington PN, Mackness M, Walker M, et al. Systemic lupus erythematosus: An independent risk factor for endothelial dysfunction in women. *Circulation*. 2004;110(4):399–404.
20. Belmont HM, Buyon J, Giorno R, Abramson S. Up-regulation of endothelial cell adhesion molecules characterizes disease activity in systemic lupus erythematosus. The Schwartzman phenomenon revisited. *Arthritis Rheum*. 1994;37(3):376–83.
21. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003;170:191–203.
22. Rho YH, Chung CP, Oeser A, Solus J, Raggi P, Gebretsadik T, et al. Novel cardiovascular risk factors in premature coronary atherosclerosis associated with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* [Internet]. 2008;35(9):1789–94. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2574747&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
23. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1725–34.
 24. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.* 1992;35(6):630–40.
 25. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation.* 2005;112(17):2735–52.
 26. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA [Internet].* 2014;311(5):507–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24352797>
 27. Wu T, Xie C, Wang HW, Zhou XJ, Schwartz N, Calixto S, et al. Elevated urinary VCAM-1, P-selectin, soluble TNF receptor-1, and CXC chemokine ligand 16 in multiple murine lupus strains and human lupus nephritis. *J Immunol.* 2007;179(10):7166–75.
 28. Egerer K, Feist E, Rohr U, Pruss A, Burmester GR, Dörner T. Increased serum soluble CD14, ICAM-1 and E-selectin correlate with disease activity and prognosis in systemic lupus erythematosus. *Lupus [Internet].* 2000;9:614–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11035437>
 29. Somers EC, Marder W, Kaplan MJ, Brook RD, McCune WJ. Plasminogen activator

- inhibitor-1 is associated with impaired endothelial function in women with systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1051:271–80.
30. Adamska A, Karczewska-Kupczewska M, Nikołaajuk A, Otziomek E, Górska M, Kowalska I, et al. Relationships of serum soluble E-selectin concentration with insulin sensitivity and metabolic flexibility in lean and obese women. *Endocrine.* 2014;45(3):422–9.
 31. Matsumoto K, Sera Y, Abe Y, Tominaga T, Horikami K, Hirao K, et al. High serum concentrations of soluble E-selectin correlate with obesity but not fat distribution in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2002;51(7):932–4.
 32. Trøseid M, Lappegård KT, Mollnes TE, Arnesen H, Seljeflot I. Changes in serum levels of E-selectin correlate to improved glycaemic control and reduced obesity in subjects with the metabolic syndrome. *Scand J Clin Lab Invest.* 2005;65(4):283–90.
 33. Barnard SA, Pieters M, De Lange Z. The contribution of different adipose tissue depots to plasma plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels. *Blood Rev [Internet].* 2016; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268960X16300200>
 34. Alessi MC, Juhan-Vague I. Metabolic syndrome, haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost.* 2008;99(6):995–1000.
 35. Gutiérrez MA, Garcia ME, Rodriguez JA, Rivero S, Jacobelli S. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and prolactin secretion in systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 1998;7(6):404–8.
 36. Seals DR, Jablonski KL, Donato AJ. Aging and vascular endothelial function in humans. *Clin Sci.* 2011;120(9):357–375.
 37. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 2003;24(6):326–33.
 38. Vestweber D. Regulation of endothelial cell contacts during leucocytes extravasation.

- Curr Opin Cell Biol [Internet]. 2002;14:587–93. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955067402003721>
39. Privratsky JR, Newman D k, Newman PJ. PECAM-1: Conflicts of Interest in Inflammation. *Life Sci*. 2010;87(3–4):69–82.
 40. Ahearn JM, Liu C, Kao AH, Manzi S. Biomarkers for systemic lupus erythematosus. *Transl Res* [Internet]. 2012;159(4):326–42. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.trsl.2012.01.021>
 41. Spronk PE, Bootsma H, Huitema MG, Limburg PC, Kallenberg CG. Levels of soluble VCAM-1, soluble ICAM-1, and soluble E-selectin during disease exacerbations in patients with systemic lupus erythematosus (SLE); a long term prospective study. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 1994;97:439–44. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1534867&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 42. Dichi I, Simão ANC. Metabolic syndrome: new targets for an old problem. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2012;16(2):147–50. Available from:
<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728222.2012.648924>
 43. Walkiewicz-Pielaszek K, Swacha M, Bułło-piontecka B, Rutkowski B, Olesińska M. Mycophenolate mofetil – 20 years of experience in treatment of rheumatic diseases. *Postep Hig Med Dosw*. 2015;69:176–87.
 44. Weigel G, Bertalanffy P, Wolner E. Depletion of intracellular GTP results in nuclear factor-kappa B activation and intercellular adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Mol Pharmacol*. 2002;62(3):453–62.
 45. Raab M, Daxecker H, Karimi A, Markovic S, Cichna M, Markl P, et al. In vitro effects of mycophenolic acid on the nucleotide pool and on the expression of adhesion molecules of human umbilical vein endothelial cells. *Clin Chim Acta*. 2001;310:89–98.

46. Ventura CG, Coimbra TM, Campos SB, Castro I, Yu L, Seguro AC. Mycophenolate Mofetil Attenuates Renal Ischemia/ Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:2524–33.
47. Blaheta RA, Leckel K, Wittig B, Zenker D, Oppermann E, Harder S, et al. Mycophenolate mofetil impairs transendothelial migration of allogeneic CD4 and CD8 T-cells. *Transplant Proc.* 1999;31(1–2):1250–2.
48. Lewis M, D’Cruz D. Adhesion molecules, mycophenolate mofetil and systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2005;14:s17–26.
49. Hauser IA, Johnson DR, Thevenod F, Goppelt-Strube M. Effect of mycophenolic acid on TNF alpha-induced expression of cell adhesion molecules in human venous endothelial cells in vitro. *Br J Pharmacol.* 1997;122:1315–22.

Table 1. Socio-demographic variables and biomarker data in patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and healthy controls.

Variables	Controls	SLE	F/x²/KW	df	p
Age (years)	39.1(6.9)	39.9(13.5)	0.16	1/171	0.687
Sex (Female/Male)	48/0	120/6	2.37	1	0.124
Caucasian/Not caucasian	44/4	77/49	15.32	1	<0.001
BMI (kg/m²)	24.1(3.2)	27.6(6.3)	13.23	1/167	<0.001
Waist Circumference	86.8(8.8)	92.7(14.3)	6.82	1/161	0.010
Met S (Yes/No)	3/45	63/60	29.46	1	<0.001
Hypertension (Yes/No)	2/37	52/71	18.39	1	<0.001
SLEDAI	0.0(0.0)	4.5(4.4)	KW	-	<0.001
ANA	0.0(0.0)	1258(2217)	KW	-	<0.001
DNA titer	0.0(0.0)	31.1(130.9)	KW	-	<0.001
Cortisol (µg/dL)	14.6(6.1)	7.5(4.9)	19.13	1/132	<0.001

Data are shown as mean (\pm SD). F/x²/KW: values of ANOVA (F), analysis of contingency tables (x²) a Kruskal-Wallis tests. BMI: body mass index; MetS: Metabolic Syndrome; SLEDAI: Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; ANA: antinuclear antibodies; DNA: deoxyribonucleic acid.

Table 2. Results of multivariate General Linear Model (GLM) analysis with the adhesion molecules as dependent variables and diagnosis, sex, ethnicity, age and body mass index (BMI) as explanatory variables.

Type tests	Dependent variables	Independent variables	F	df	p
Multivariate	All 6 adhesion molecules	SLE	20.58	6/157	<0.001
		Sex	1.23	6/157	0.296
		Ethnicity	0.52	6/157	0.791
		Age	3.32	6/157	0.004
		BMI	2.85	6/157	0.012
Between-subject effects	PECAM-1	SLE	88.25	1/162	<0.001
	ICAM-1	SLE	1.15	1/162	0.286
	VCAM-1	SLE	35.58	1/162	<0.001
	E-SELECTIN	SLE	39.57	1/162	<0.001
	P-SELECTIN	SLE	48.72	1/162	<0.001
	PAI-1	SLE	30.06	1/162	<0.001
	VCAM-1	Age (+)	8.29	1/162	0.005
	P-SELECTIN	Age (+)	4.85	1/162	0.029
E-SELECTIN	BMI (+)	10.46	1/162	0.001	
Multivariate	All 6 adhesion molecules	SLE	10.36	6/156	<0.001
		Antimalarials	0.95	6/156	0.465
Multivariate	All 6 adhesion molecules	SLE	17.47	6/156	<0.001
		Immunosuppressives	0.74	6/156	0.617
Multivariate	All 6 adhesion molecules	SLE	19.82	6/156	<0.001
		Statins	1.29	6/156	0.267
Multivariate	All 6 adhesion molecules	SLE	18.50	6/156	<0.001
		Mycophenolate	3.49	6/156	0.003
Between-subject effects	ICAM-1	Mycophenolate (-)	4.10	1/161	0.045
	E-SELECTIN	Mycophenolate (+)	6.48	1/161	0.012
Multivariate	All 6 adhesion molecules	SLE	18.51	6/134	<0.001
		Prednisone	1.32	6/134	0.255
Multivariate	All 6 adhesion molecules	SLE	16.05	6/147	<0.001
		Hypertension	2.04	6/147	0.064
Multivariate	All 6 adhesion molecules	SLE	18.07	6/154	<0.001
		MetS	5.62	6/154	<0.001
		E-SELECTIN	MetS	22.98	1/159
	PAI-1	MetS	3.39	1/159	0.027

All adhesion molecules are processed in Ln transformation. PECAM-1: platelet endothelial cell adhesion molecule 1; ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1; PAI-1: plasminogen activator inhibitor type-1; SLE: Systemic Lupus Erythematosus; BMI: body mass index; MetS: Metabolic Syndrome.

Table 3. Estimated marginal mean (SE) values of the 6 adhesion molecules obtained by the multivariate General Linear Model (GLM) analysis shown in table 2 (with ethnicity, sex, age, BMI and metabolic syndrome as covariables).

Variables	Controls	SLE
PECAM-1 (pg/mL)	27657 (2742)	42165 (2088)
ICAM-1 (pg/mL)	307578 (434609)	551985 (330876)
VCAM-1 (pg/mL)	632196 (103084)	977995 (78480)
E-SELECTIN (pg/mL)	117343 (27023)	200452 (20573)
P-SELECTIN (pg/mL)	132944 (19652)	200334 (14962)
PAI-1 (pg/mL)	99921 (26985)	156020 (20545)

PECAM-1: platelet endothelial cell adhesion molecule 1; ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1; PAI-1: plasminogen activator inhibitor type-1.

Table 4. Results of binary logistic regression analysis with SLE as dependent variable (and control as reference group), adhesion molecules and metabolic syndrome as explanatory variable.

Independent variables	Wald	df	p	Odds Ratio	95% CI	Nagelkerke
PECAM-1	36.44	1	<0.001	1.29	1.19-1.40	0.572
ICAM-1	21.07	1	<0.001	1.00	1.00-1.00	0.267
VCAM-1	27.54	1	<0.001	1.25	1.15-1.36	0.379
E-SELECTIN	30.10	1	<0.001	1.03	1.02-1.03	0.362
P-SELECTIN	15.46	1	<0.001	1.02	1.01-1.03	0.251
PECAM-1 + PAI-1¹	30.41	1	<0.001	1.26	1.16-1.36	0.642
PECAM-1 + PAI-1 + MetS²	26.56	1	<0.001	1.25	1.15-1.36	0.699
	9.29	1	0.002	1.02	1.01-1.03	
	9.65	1	0.002	1.02	1.01-1.02	
	9.22	1	0.002	9.61	2.23-41.42	

PECAM-1: platelet endothelial cell adhesion molecule 1; ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1; PAI-1: plasminogen activator inhibitor type-1; MetS: Metabolic Syndrome.

¹ 85.1% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 86.5% and specificity of 81.3%

² 88.9% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 88.6% and specificity of 89.6%

Table 5. Results of (stepwise automatic) univariate regression analyses with the SLEDAI score as dependent variable.

	Explanatory variables (t and p value)	F	df	P	R²(%)
(1)	PECAM-1 (t=+4.48, p<0.001)	20.07	1/168	< 0.001	10.7%
(2)	PECAM-1 (t=+3.87, p<0.001); ANA (t=+1.91, p=0.058)	12.01	2/167	< 0.001	12.6%
(3)	PECAM-1 (t=+4.18, p<0.001); DNA titers (t=+2.79, p=0.006)	14.02	2/171	< 0.001	14.1%
(4)	PECAM-1 (t=+3.48, p=0.001); MetS (t=+2.60, p=0.010)	14.59	2/168	< 0.001	14.8%
(5)	PECAM-1 (t=+5.10, p=0.002); DNA titers (t=+2.63, p=0.009); MetS (t=+2.70, p=0.008)	12.38	3/167	< 0.001	18.2%

(1) Stepwise automatic

(2) With forced entry of ANA

(3-5) With entry of DNA titers or/and Metabolic Syndrome presence (MetS)

PECAM-1: platelet endothelial cell adhesion molecule 1; ANA: antinuclear antibodies; DNA: deoxyribonucleic acid; MetS: Metabolic Syndrome.

Table 6. Results of multivariate General Linear Model (GLM) analyses with the adhesion molecules as dependent variables and antinuclear antibodies (ANA), deoxyribonucleic acid (DNA) titers and plasma cortisol as explanatory variables.

Type tests	Dependent variables	Independent variables	F	df	p
Multivariate (1)	All 6 adhesion molecules	ANA	3.40	6/153	0.004
Between-subject effects	PECAM-1	ANA	11.13	1/158	0.001
	VCAM-1	ANA	11.58	1/158	0.001
	E-SELECTIN	ANA	9.26	1/158	0.003
	PAI-1	ANA	5.21	1/158	0.024
Multivariate (2)	All 6 adhesion molecules	DNA titers	0.88	6/157	0.509
Multivariate (3)	All 6 adhesion molecules	Cortisol	2.88	6/117	0.012
Between-subject effects	PECAM-1	Cortisol (-)	5.87	1/122	0.017
	ICAM-1	Cortisol (-)	4.09	1/122	0.045

PECAM-1: platelet endothelial cell adhesion molecule 1; ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1; PAI-1: plasminogen activator inhibitor type-1; ANA: antinuclear antibodies; DNA: acid.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo permite as seguintes conclusões:

- Pacientes com LES apresentaram aumento nos níveis séricos das MACs (VCAM-1, PECAM-1, E-Selectina, P-Selectina) e do PAI-1 quando comparados ao grupo controle;
- O diagnóstico de LES, a idade, o IMC, o uso de micofenolato, a presença de SM, a presença de ANA, os títulos de DNA e os níveis de cortisol podem influenciar os níveis séricos de moléculas de adesão. Os níveis de VCAM-1, PECAM-1, E-Selectina, P-Selectina, e do PAI-1 foram positivamente associados a presença de LES. O aumento da idade influenciou positivamente os níveis de VCAM-1 e P-Selectina, enquanto o IMC provocou efeito semelhante sobre E-Selectina. O uso de micofenolato afetou negativamente os níveis de ICAM-1 e positivamente os níveis de E-Selectina. A presença de SM afetou os níveis de E-Selectina e, de PAI-1, enquanto ANA influenciou os níveis de PECAM-1, VCAM-1, E-Selectina e, de PAI-1. Por fim, os níveis de cortisol influenciaram negativamente os níveis de PECAM-1 e ICAM-1;
- Foi proposto um modelo de preditores para o diagnóstico de LES utilizando-se níveis de PECAM-1, PAI-1 e a presença de SM, e este foi capaz de classificar corretamente 88.9% de todos os casos com sensibilidade de 88.6% e especificidade de 89.6%;
- Foi proposto um modelo de preditores para o escore SLEDAI no qual utilizou-se os níveis de PECAM-1, títulos de anti-dsDNA e presença de SM, e este foi capaz de explicar 18.2% da variação observada no escore SLEDAI.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos dados demonstraram que níveis séricos de moléculas de adesão foram associados com o diagnóstico de LES e a atividade da doença, sendo influenciados pela idade, IMC, ANA, títulos de anti-dsDNA, níveis de cortisol, presença de SM e uso de micofenolato podem influenciar suas concentrações. Algumas moléculas de adesão podem ser utilizadas como preditores da doença e de sua atividade.

Futuros estudos são necessários para melhorar a compreensão sobre a fisiopatologia do LES e permitir a implementação de MACs para o monitoramento da resposta ao tratamento e detecção precoce de manifestações clínicas do LES, além de propor novos alvos terapêuticos.

8. REFERENCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*, 8^a Ed. Elsevier, 2015.
- ABD-ELKAREEM, M. et al. Increased urinary levels of the leukocyte adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in human lupus nephritis with advanced renal histological changes: Preliminary findings. **Clin Exp Nephrol**, v. 14, n. 6, p. 548–557, 2010.
- AHMADPOOR, P.; DALILI, N.; ROSTAMI, M. An update on pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, v. 8, n. 3, p. 171–184, 2014.
- ALESSI, M. C.; JUHAN-VAGUE, I. Metabolic syndrome, haemostasis and thrombosis. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 99, n. 6, p. 995–1000, 2008.
- ALON, R.; HAMMER, D. A.; SPRINGER, T. A. Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. **Nature**, v. 374, n. 6522, p. 539–542, 1995.
- ARICESCU, A. R.; JONES, E. Y. Immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules : zippers and signals. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 19, p. 543–550, 2007.
- BARACZKA, K. et al. Concentration of Soluble Adhesion Molecules (sVCAM-1 , sICAM-1 and sL-Selectin) in the Cerebrospinal Fluid and Serum of Patients with Multiple Sclerosis and Systemic Lupus erythematosus with Central Nervous Involvement. **Neuroimmunomodulation**, v. 9, p. 49–54, 2001.
- BARCLAY, A. N. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains — a master superfamily of interaction molecules. **Seminars in Immunology**, v. 15, p. 215–223, 2003.
- BARNARD, S. A.; PIETERS, M.; DE LANGE, Z. The contribution of different adipose tissue depots to plasma plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels. **Blood Reviews**, 2016.
- BARTHEL, S. R. et al. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. **Expert Opin Ther Targets**, v. 11, n. 11, p. 1473–1491, 2007.
- BARTOLONI, E.; SHOENFELD, Y.; GERLI, R. Inflammatory and autoimmune mechanisms in the induction of atherosclerotic damage in systemic rheumatic diseases: Two faces of the same coin. **Arthritis Care and Research**, v. 63, n. 2, p. 178–183, 2011.
- BATUCA, J. R. et al. Anti-atherogenic and anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein are affected by specific antibodies in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v. 48, p. 26–31, 2009.
- BELMONT, H. M. et al. Up-regulation of endothelial cell adhesion molecules characterizes disease activity in systemic lupus erythematosus. The Schwartzman phenomenon revisited. **Arthritis and rheumatism**, v. 37, n. 3, p. 376–383, 1994.

- BENGTSSON, A. A.; RÖNNBLÖM, L. Systemic lupus erythematosus : still a challenge for physicians. **Journal of Internal Medicine**, 2016.
- BERLIN, C. et al. A4 Integrins Mediate Lymphocyte Attachment and Rolling Under Physiologic Flow. **Cell**, v. 80, n. 3, p. 413–422, 1995.
- BERTSIAS, G. et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, p. 195–205, 2008.
- BLANKENBERG, S.; BARBAUX, S.; TIRET, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 170, p. 191–203, 2003.
- BOMBARDIER, C. et al. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. **Arthritis and rheumatism**, v. 35, n. 6, p. 630–640, 1992.
- BRELAND, U. M. et al. Inflammatory markers in patients with coronary artery disease with and without inflammatory rheumatic disease. **Rheumatology**, v. 49, p. 1118–1127, 2010.
- CARVALHO, M. A. P.; BÉRTOLO, M. B.; LANNA, C. C. D. Reumatologia diagnóstico e tratamento, **4ª Ed.** Guanabara Kogan, 2014.
- CHEN, X.; GUMBINER, B. M. Crosstalk between different adhesion molecules. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, p. 572–578, 2006.
- CHESNUTT, B. C. et al. Induction of LFA-1-dependent neutrophil rolling on ICAM-1 by engagement of E-selectin. **Microcirculation**, v. 13, p. 99–109, 2006.
- COZZANI, E. et al. Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects, Serology of Lupus Erythematosus: Correlation between Immunopathological Features and Clinical Aspects. **Autoimmune Diseases**, v. 2014, 2014, p. e321359, 2014.
- CYBULSKY, M. I. et al. A major role for VCAM-1 , but not ICAM-1 , in early atherosclerosis. **J. Clin. Invest.**, v. 107, p. 1255–1262, 2001.
- D'CRUZ, D. P.; KHAMASHTA, M. A.; HUGHES, G. R. V. Systemic Lupus erythematosus. **The Lancet**, v. 369, p. 587–596, 2007.
- DIAMOND, B. et al. Moving towards a cure: blocking pathogenic antibodies in systemic lupus erythematosus. **J Intern Med**, v. 269, n. 1, p. 36–44, 2011.
- EL-MESALLAMY, H. O.; HAMDY, N. M.; IBRAHIM, S. M. Adiponectin and pro-inflammatory cytokines in obese diabetic boys. **Indian Pediatrics**, v. 48, n. 10, p. 815–816, 2011.
- ERIKSSON, E. E. et al. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. **The Journal**

of **experimental medicine**, v. 194, n. 2, p. 205–218, 2001.

FAY, W. P. Plasminogen Activator Inhibitor 1, Fibrin, and the Vascular Response to Injury. **Trends Cardiovasc Med**, v. 14, n. 5, p. 196–202, 2004.

FESTA, A. et al. Chronic Subclinical Inflammation as Part of the Insulin Resistance Syndrome : The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). **Circulation Journal of American Heart Association**, v. 102, p. 42–47, 2000.

FONT, J. et al. Increased serum levels of soluble L -selectin (CD62L) in patients with active systemic lupus erythematosus (SLE). **Clin Exo Immunol**, v. 119, p. 169–174, 2000.

FORD, E. S.; GILES, W. H.; DIETZ, W. H. Prevalence of the Metabolic Syndrome Among US Adults. **The Journal of the American Medical Association**, v. 287, n. 3, p. 356–359, 2002.

FRANCISCHETTI, I. et al. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperusão. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, v. 25, n. 4, p. 575–584, 2010.

FREEMONT, A. J.; HOYLAND, J. A. Cell adhesion molecules. **J Clin Pathol: Mol Pathol**, v. 49, p. M321–M330, 1996.

FROSTEGÄRD, J. et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques : dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. **Atherosclerosis**, v. 145, p. 33–43, 1999.

FROSTEGÄRD, J. Prediction and management of cardiovascular outcomes in systemic lupus erythematosus. **Expert review of Clinical Immunology**, v. 11, p. 247–253, 2014.

FU, S. M. et al. Anti-dsDNA Antibodies are one of the many autoantibodies in systemic lupus erythematosus. **F1000Research**, v. 4, n. F1000 Faculty Rev, p. 939–945, 2015.

GEARING, A. J. H. et al. Soluble forms of vascular adhesion molecules, E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1: Pathological significance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 667, n. 865, p. 324–331, 1992.

GEARING, A. J. H.; NEWMAN, W. Circulating adhesion molecules in tuberculosis. **Immunology Today**, v. 14, n. 10, p. 506–512, 1993.

GIRALDO, W. A. S. et al. New Targets in Systemic Lupus (Part 2/2). **Reumatol Clin.**, v. 8, n. 5, p. 263–269, 2012.

GOLIAS, C. et al. Physiology and Pathophysiology of Selectins , Integrins , and IgSF Cell Adhesion Molecules Focusing on Inflammation . A Paradigm Model on Infectious Endocarditis. **Cell Communication & Adhesion**, v. 18, p. 19–32, 2011.

GOMES, M. A. M.; MACÊDO NETO, N. C.; BISPO, I. G. A. Interleucina-6, Moléculas de Adesão Intercelular-1 e Microalbuminúria na Avaliação da Lesão Endotelial: Revisão de Literatura. **Rev SOCERJ**, v. 22, n. 6, p. 398–403, 2009.

- GÓMEZ-ZUMAQUERO, J. M. et al. Association of biological markers of activity of systemic lupus erythematosus with levels of anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies. **Rheumatology**, v. 43, p. 510–513, 2004.
- GRUNDY, S. M. et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. **Circulation**, v. 112, n. 17, p. 2735–2752, 2005.
- GRYGIEL-GÓRNIAK, B.; PUSZCZEWICZ, M. J. The influence of endogenous and exogenous sex hormones on systemic lupus erythematosus in pre- and postmenopausal women. **Przegląd menopauzalny = Menopause review**, v. 13, n. 4, p. 262–266, 2014.
- GUSTAFSSON, J. T. et al. Risk factors for cardiovascular mortality in patients with systemic lupus erythematosus, a prospective cohort study. **Arthritis Research & Therapy**, v. 14, p. R46–R57, 2012.
- HA, H.; OH, E. Y.; LEE, H. B. The role of plasminogen activator inhibitor 1 in renal and cardiovascular diseases. **Nature reviews. Nephrology**, v. 5, n. 4, p. 203–211, 2009.
- HANLY, J. G.; WALSH, N. M.; SANGALANG, V. Brain pathology in systemic lupus erythematosus. **J Rheumatol.**, v. 19, n. 5, p. 732–741, 1992.
- HE, X. et al. Deficiency of P-selectin or P-selectin glycoprotein ligand-1 leads to accelerated development of glomerulonephritis and increased expression of CC chemokine ligand 2 in lupus-prone mice. **J.Immunol.**, v. 177, p. 8748–8756, 2006.
- HEJAZI, E. Z.; WERTH, V. P. Cutaneous Lupus Erythematosus: An Update on Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 17, n. 2, p. 135–146, 2016.
- HERRMANN, M. et al. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis and rheumatism**, v. 41, n. 7, p. 1241–1250, 1998.
- HIRATA, T. et al. Biochemical and Biophysical Research Communications A novel splice variant of human L-selectin encodes a soluble molecule that is elevated in serum of patients with rheumatic diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 462, p. 371–377, 2015.
- HOCHBERG, M. C. Updating the American College of Rheumatology. **Arthritis and Rheumatism**, v. 40, n. 9, p. 1725–1734, 1997.
- HUANG, Q.; POPE, R. M. Toll-like receptor signaling: a potential link among rheumatoid arthritis, systemic lupus, and atherosclerosis. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, p. 253–262, 2010.
- JANSSEN, B. A. et al. Correlation of blood levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 with disease activity in Systemic Lupus Erythematosus and vasculitis. **British Journal of Rheumatology**, v. 33, p. 1112–1116, 1994.

KADONO, T. et al. Leukocyte Rolling Velocities and Migration Are Optimized by Cooperative L-Selectin and Intercellular Adhesion Molecule-1 Functions. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 4542–4550, 2002.

KANAPATHIPPILLAI, P. et al. Nucleosomes contribute to increase mesangial cell chemokine expression during the development of lupus nephritis. **Cytokine**, v. 62, p. 244–252, 2013.

KHATOON, F. et al. Physicochemical and immunological studies on 4-hydroxynonenal modified HSA: Implications of protein damage by lipid peroxidation products in the etiopathogenesis of SLE. **Human Immunology**, v. 73, p. 1132–1139, 2012.

KLEIN, R. M. et al. Circulating adhesion molecules (cICAM-1, lcVCAM-1) in patients with suspected inflammatory heart muscle disease. **Z Kardiol**, v. 87, n. 2, p. 84–93, 1998.

KLING, E. et al. Circulating intercellular adhesion molecule 1 as a new activity marker in patients with systemic lupus erythematosus. **The Clinical Investigator**, v. 71, p. 299–304, 1993.

KNIGHT, J. S.; KAPLAN, M. J. Cardiovascular disease in lupus: insights and updates. **Current opinion in rheumatology**, v. 25, n. 5, p. 597–605, 2013.

KOHLER, H. P.; GRANT, P. J. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 24, p. 1792–1801, 2000.

KWIECINSKI, J. et al. Relationship between elevated cerebrospinal fluid levels of plasminogen activator inhibitor 1 and neuronal destruction in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 7, p. 2094–2101, 2009.

LALWANI, P. et al. Serum thiols as a biomarker of disease activity in lupus nephritis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–12, 2015.

LEWIS, M. et al. Improved monitoring of clinical response in Systemic Lupus Erythematosus by longitudinal trend in soluble vascular cell adhesion molecule-1. **Arthritis research & therapy**, v. 18, n. 5, p. 1–11, 2016.

LEWIS, M.; D'CRUZ, D. Adhesion molecules, mycophenolate mofetil and systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 14, p. s17–s26, 2005.

LEY, K. et al. Getting to the site of inflammation : the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature**, v. 7, p. 678–689, 2007.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Inflammation in Atherosclerosis. **Official Journal of the Japanese Circulation Society**, v. 74, p. 213–220, 2010.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; HANSSON, G. K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**, v. 473, p. 317–325, 2011.

LISNEVSKAIA, L.; MURPHY, G.; ISENBERG, D. Systemic lupus erythematosus. **The Lancet**, v. 384, n. 9957, p. 1878–1888, 2014.

LONG, H. et al. The critical role of epigenetics in systemic lupus erythematosus and autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, p. 1–21, 2016.

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

LOZOVOY, M. A. B. et al. Hypertension is associated with serologically active disease in patients with systemic lupus erythematosus: role of increased Th1/Th2 ratio and oxidative stress. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 43, p. 59–62, 2014.

MASSOT, A. et al. Predictive value of ankle-brachial index and PAI-1 in symptomatic intracranial atherosclerotic disease recurrence. **Atherosclerosis**, v. 233, p. 186–189, 2014.

MCGARY, E. C.; LEV, D. C.; BAR-ELI, M. Cellular Adhesion Pathways and Metastatic Potential of Human Melanoma. **Cancer Biology & Therapy**, v. 1, n. 5, p. 454–465, 2002.

MCHALE, J. F. et al. Vascular endothelial cell expression of ICAM-1 and VCAM-1 at the onset of eliciting contact hypersensitivity in mice: evidence for a dominant role of TNF-alpha. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 1648–1655, 1999.

MCMAHON, M.; HAHN, B. H. Atherosclerosis and Systemic Lupus Erythematosus - Mechanistic Basis of the Association. **Curr Opin Immunol.**, v. 19, n. 4, p. 633–639, 2007.

MCMURRAY, R. W. Adhesion Molecules in Autoimmune Disease Robert. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 25, n. 4, p. 215–233, 1996.

MIDDLETON, J. et al. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. **Cell**, v. 91, p. 385–395, 1997.

MIKDASHI, J. A. Altered functional neuronal activity in neuropsychiatric lupus: A systematic review of the fMRI investigations. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 45, n. 4, p. 455–462, 2016.

MILLER, M. A.; CAPPUCIO, F. P. Ethnicity and inflammatory pathways - implications for vascular disease, vascular risk and therapeutic intervention. **Curr Med Chem.**, v. 14, n. 13, p. 1409–1425, 2007.

MIYASAKA, M.; TANAKA, T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 5, p. 360–370, 2004.

MOJCIK, C. F.; SHEVACH, E. M. Adhesion Molecules. **Arthritis and Rheumatism**, v. 40, p. 991–1004, 1997.

MORRIS, D. L. et al. Variation in the upstream region of P-Selectin (SELP) is a risk factor for SLE. **Genes and Immunity**, v. 10, p. 404–413, 2009.

MULLER, W. A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 6, p. 326–333, 2003.

MURDACA, G. et al. Endothelial dysfunction in rheumatic autoimmune diseases. **Atherosclerosis**, v. 224, p. 309–317, 2012.

NAKASHIMA, C. A. K. et al. Incidência e aspectos clínico-laboratoriais do Lúpus eritematoso sistêmico em cidade do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 3, p. 235–239, 2011.

NAKATANI, K. et al. Enhanced expression of the soluble form of E-selectin attenuates progression of lupus nephritis and vasculitis in MRL/lpr mice. **Immunity, inflammation and disease**, v. 1, n. 1, p. 37–46, 2013.

NAWAWI, H. et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-6 levels reflect endothelial dysfunction in patients with primary hypercholesterolaemia treated with atorvastatin. **Atherosclerosis**, v. 169, p. 283–291, 2003.

NICHOLL, S. M.; ROZTOCIL, E.; DAVIES, M. G. Plasminogen activator system and vascular disease. **Curr Vasc Pharmacol.**, v. 4, n. 2, p. 101–116, 2006.

NORMAN, M. U.; JAMES, W. G.; HICKEY, M. J. **Differential roles of ICAM-1 and VCAM-1 in leukocyte-endothelial cell interactions in skin and brain of MRL/faslpr mice**, 2008.

NYBERG, F.; STEPHANSSON, E. Elevated soluble E-selectin in cutaneous lupus erythematosus. **Adv Exp Med Biol.**, v. 455, p. 153–159, 1999.

PAMUK, O. N. et al. PECAM-1 gene polymorphisms and soluble PECAM-1 level in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients: any link with clinical atherosclerotic events? **Clinical Rheumatology**, v. 33, n. 12, p. 1737–1743, 2014.

PAN, L. et al. Research advances on structure and biological functions of integrins Background. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1094, p. 1–11, 2016.

PARKER, B.; BRUCE, I. N. The metabolic syndrome in systemic lupus erythematosus. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 36, p. 81–97, 2010.

PATHAN, F.; NEGISHI, K. Prediction of cardiovascular outcomes by imaging coronary atherosclerosis. **Cardiovascular Diagnosis and Therapy**, v. 6, n. 4, p. 322–339, 2016.

PHELAN, M.; KERINS, D. M. The Role of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in the Metabolic Syndrome and Its Regulation. **Journal of Food Research**, v. 3, n. 6, p. 36–53, 2014.

PICKERING, T. G. et al. American Heart Association Council on High Blood Pressure Research Professionals From the Subcommittee of Professional and Public Education of the Animals: Part 2: Blood Pressure Measurement in Experimental Animals: A Statement for Recommendations for Blo. **Circulation**, v. 111, n. December 2004, p. 697–716, 2005.

PONS-ESTEL, G. J. et al. Understanding the Epidemiology and Progression of Systemic Lupus Erythematosus. **Semin Arthritis Rheum.**, v. 39, n. 4, p. 1–23, 2010.

- PRASAD, M. et al. Cardiorheumatology: cardiac involvement in systemic rheumatic disease. **Nat Rev Cardiol.**, v. 12, n. 3, p. 168–176, 2015.
- PRIVRATSKY, J. R.; NEWMAN, D. K.; NEWMAN, P. J. PECAM-1: Conflicts of Interest in Inflammation. **Life Sci**, v. 87, n. 3–4, p. 69–82, 2010.
- PURI, K. D. et al. The role of endothelial PI3K γ activity in neutrophil trafficking. **Blood**, v. 106, p. 150–157, 2005.
- RAO, R. M. et al. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. **Circulation Research**, v. 101, n. 3, p. 234–247, 2007.
- RENAU, A.; ISENBERG, D. A. Male versus female lupus: a comparison of ethnicity, clinical features, serology and outcome over a 30 year period. **Lupus**, v. 21, p. 1041–1048, 2012.
- RHO, Y. H. et al. Novel cardiovascular risk factors in premature coronary atherosclerosis associated with systemic lupus erythematosus. **The Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 9, p. 1789–1794, 2008.
- ROMAN, M. J. et al. Rate and determinants of progression of atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 56, n. 10, p. 3412–3419, 2007.
- SABRY, A. et al. Intercellular adhesion molecules in systemic lupus erythematosus patients with lupus nephritis. **Clinical Rheumatology**, v. 26, p. 1819–1823, 2007.
- SALAS, A. et al. Rolling adhesion through an extended conformation of integrin α L β 2 and relation to α I and β I-like domain interaction. **Immunity**, v. 20, n. 4, p. 393–406, 2004.
- SAVOY, C.; VAN LIESHOUT, R. J.; STEINER, M. Is plasminogen activator inhibitor-1 a physiological bottleneck bridging major depressive disorder and cardiovascular disease? **Acta Physiologica**, 2016.
- SHATTIL, S. J.; KIM, C.; GINSBERG, M. H. The final steps of integrin activation : the end game. **Nature**, v. 11, p. 288–300, 2010.
- SINGH, N. K. et al. Elevated plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) as contributing factor in pathogenesis of hypercoagulable state in antiphospholipid syndrome. **Rheumatology International**, v. 33, p. 2331–2336, 2013.
- SINGH, S. et al. Urine VCAM-1 as a marker of renal pathology activity index in lupus nephritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 14, n. R164, p. 1–11, 2012.
- SIXT, M. et al. Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Cell Biology**, v. 153, n. 5, p. 933–945, 2001.
- SKEOCH, S. et al. Cell adhesion molecules as potential biomarkers of nephritis, damage and accelerated atherosclerosis in patients with SLE. **Lupus**, v. 23, p. 819–824, 2014.

- SOMERS, E. C. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 is associated with impaired endothelial function in women with systemic lupus erythematosus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1051, p. 271–280, 2005.
- SOMERS, E. C. et al. Incidence of systemic lupus erythematosus in the United Kingdom, 1990-1999. **Arthritis Care and Research**, v. 57, n. 4, p. 612–618, 2007.
- SPERANDIO, M. et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 10, p. 1355–1363, 2003.
- SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, v. 346, n. 2, p. 425–434, 1990.
- STÅHL-HALLENGREN, C. et al. Incidence studies of systemic lupus erythematosus in Southern Sweden: Increasing age, decreasing frequency of renal manifestations and good prognosis. **J Rheumatol.**, v. 27, n. 3, p. 685–691, 2000.
- STIELKE, S. et al. Adhesion molecule expression precedes brain damages of lupus-prone mice and correlates with kidney pathology. **Journal of Neuroimmunology**, v. 252, p. 24–32, 2012.
- SVENUNGSSON, E. et al. Risk Factors for Cardiovascular Disease in Systemic Lupus Erythematosus. **Circulation**, v. 104, n. 16, p. 1887–1893, 2001.
- TEDDER, T. F. et al. The selectins : L-Selectin. **The FASEB Journal**, v. 9, p. 866–873, 1995.
- TELLES, R. et al. Metabolic syndrome in patients with systemic lupus erythematosus: association with traditional risk factors for coronary heart disease and lupus characteristics. **Lupus**, v. 19, p. 803–809, 2010.
- TURKCAPAR, N. et al. Vasculitis and expression of vascular cell adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1, and E-selectin in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. **The Journal of Rheumatology**, v. 32, n. 6, p. 1063–1070, 2005.
- URAMOTO, K. M. et al. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. **Arthritis and rheumatism**, v. 42, n. 1, p. 46–50, 1999.
- VAN GILS, J. M.; ZWAGINGA, J. J.; HORDIJK, P. L. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 85, p. 195–204, 2009.
- VAUGHAN, D. E. PAI-1 and atherothrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, p. 1879–1883, 2005.
- VELO-GARCÍA, A.; CASTRO, S. G.; ISENBERG, D. A. The diagnosis and management of the haematologic manifestations of lupus. **Journal of Autoimmunity**, p. 1–22, 2016.
- VILAR, M. J. P.; RODRIGUES, J. M.; SATO, E. I. Incidência de lúpus eritematoso sistêmico em Natal, RN - Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 6, p. 347–351, 2003.

- WANG, A. Y. M. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphism 4G/4G genotype and lupus nephritis in Chinese patients. **Kidney International**, v. 59, p. 1520–1528, 2001.
- WANG, S. et al. Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 6, p. 1519–1532, 2006.
- WONG, C. W.; DYE, D. E.; COOMBE, D. R. The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. **International Journal of Cell Biology**, p. 1–9, 2012.
- YASUTOMO, K. Pathological lymphocyte activation by defective clearance of self-ligands in systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v. 42, p. 214–222, 2003.
- ZAMEER, A.; HOFFMAN, S. A. Increased ICAM-1 and VCAM-1 expression in the brains of autoimmune mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 142, p. 67–74, 2003.
- ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M.; MCINTYRE, T. M. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. **Immunology Today**, v. 13, n. 3, p. 93–100, 1992.
- ZONNEVELD, R. et al. Soluble adhesion molecules as markers for sepsis and the potential pathophysiological discrepancy in neonates, children and adults. **Critical care**, v. 18, p. 204–218, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da pesquisa:

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

Prezado(a) Senhor(a):

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

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

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

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

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

Londrina, ___ de _____ de 2012.

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Andrea Name Colado Simão

1. RG: 6226736-4

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

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

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

APÊNDICE B

Ficha de avaliação dos pacientes.

FICHA DE AVALIAÇÃO - PROJETO LES

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

PESO	ALTURA	IMC	CIRC. ABDOMINAL	PRESSÃO ARTERIAL

ANEXOS

ANEXO A

Escore SLEDAI - Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index

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

SLE Daily Activity Index: Data Collection Sheet

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

TOTAL SLEDAI SCORE: _____

Reprinted, with permission, from Bombardier C[72]

ANEXO B

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da Universidade Estadual de Londrina.

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Andréa Name Colado Simão

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 01865212.0.0000.5231

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Londrina - UEL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 210.328

Data da Relatoria: 19/12/2012

Apresentação do Projeto:

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

Objetivo da Pesquisa:

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Endereço: AVENIDA ROBERT KOCH, 60

Bairro: VILA OPERÁRIA

CEP: 86.038-440

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-2490

E-mail: cep268@uel.br

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



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

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todas as pendências foram respondidas adequadamente.

Recomendações:

Encaminhar relatório ao final do estudo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezada Pesquisadora,

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

Endereço: AVENIDA ROBERT KOCH, 60

Bairro: VILA OPERÁRIA

UF: PR

Telefone: (43)3371-2490

Município: LONDRINA

CEP: 86.038-440

E-mail: cep268@uel.br

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



LONDRINA, 04 de Março de 2013

Assinador por:
Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
(Coordenador)

Endereço: AVENIDA ROBERT KOCH, 60

Bairro: VILA OPERÁRIA

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-2490

CEP: 86.038-440

E-mail: cep268@uel.br

ANEXO C

Instruções para autores da revista *Rheumatology*.

Quick Submission Guide for *Rheumatology* Manuscripts

The guide is a brief summary of the requirements for submission to *Rheumatology*. For more detailed information and exact word count, please read the [Journal's instructions to authors](#).

Any material for consideration in *Rheumatology* should be submitted through <http://mc.manuscriptcentral.com/rheumatology>. Online submission requires the full names and e-mail addresses of all the authors.

Article types

Original articles: up to 3500 words, 6 tables/figures, up to 50 references
 Concise reports: up to 2000 words, 1-2 tables/figures, up to 20 references
 Reviews: up to 4000 words, 6 tables/figures, no limit on references
 Editorials: up to 1000 words, 1 table/figure, up to 10 references
 Letters: up to 800 words, 1 table/figure, up to 8 references

Format

All papers must be written in English on A4 paper, single column. Prepare your manuscript, including tables, using a word processing program and save it as a .doc or .rtf file.

Title page

Include the title of the manuscript, the full names and affiliations of all the authors (indicated by superscript numbers next to each author's name in numerical order) and the postal and e-mail addresses of the corresponding author. Include up to 10 key words that reflect the content of the article.

Abstract

For original articles, provide a structured abstract of no more than 250 words, organised into the headings Objectives, Methods, Results and Conclusions. Reviews have unstructured abstracts and letters and editorials have no abstract.

References

References in the text should be given as numbers within square brackets, placed in line with the text and in order of appearance (Vancouver style). They should be listed in numerical order at the end of the paper.

Ethical approval

Manuscripts in which experiments on patients or healthy volunteers, patients' case histories or use of genetic material are reported should state that (1) the subjects' written consent was obtained according to the Declaration of Helsinki (most recently at the General Assembly in October 2008), and (2) the study has been approved by local ethics committee/institutional review board or that it conforms to standards currently applied in the country of origin; the name of the authorizing body should be stated in the paper. This information should be added to the methods section

Patient Consent

For papers in which detailed patient information (e.g. case reports) is given, a signed [Rheumatology patient consent form](#) will need to be filled out and a statement that consent was obtained will need to be inserted in the manuscript.

Clinical trials

Rheumatology requires the registration of all clinical trials in line with [ICMJE](#) and [WHO](#) guidelines. The trial registration number should be stated at the end of the abstract in the format:

Trial registration: [name of the trial registry, registry URL, trial registration number].

Figures and tables

All figures and tables must be referenced in the text and numbered consecutively in the order that they appear in the text. Each figure/table must have a legend beginning with a brief title (no more than 10-15 words) that reflects its content. Figures should be at least 70 mm wide and 1200 dpi [dots per inch] for line drawings or 300 dpi for images and colour figures.

Key messages

Include up to 3 key messages for original articles, concise reports and reviews (1 for case reports and letters other). Each key message should be a maximum of 15 words.

Acknowledgements

Contributors who do not meet the criteria for authorship should be included in this section. Anyone acknowledged in this section must have agreed to their inclusion in the paper.

Conflict of interest statement

Papers must contain a disclosure statement indicating any potential financial conflicts of interest any of the authors may have. If none of the authors have any conflicts, insert a statement that the authors declare no conflicts of interest. See the [Journal's conflict of interest policy](#) for more information.

Funding

Details of all funding sources for the work in question should be given in a separate section entitled 'Funding'. Any role a sponsor played should be detailed in the statement. See the Journal's [funding policy](#) for more information.

Statistics

Statistical methods must be detailed and should conform to the [statistical guidelines](#) published in *Rheumatology* 2009; 48: 462-3.

Revised papers

Please submit your revised paper online via the author centre in Manuscript Central by clicking 'Manuscripts with Decisions'. To create a revised version of this manuscript, click 'create a revision' under the action column. A detailed list of author responses to reviewers' comments must be provided along with a highlighted copy of the revised manuscript that shows all the changes.