



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

NICOLE PERUGINI STADTLOBER

**ASSOCIAÇÃO DOS MARCADORES DE ESTRESSE  
OXIDATIVO E DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES COM A  
PRESENÇA E ATIVIDADE DA NEFRITE LÚPICA**

---

Londrina  
2016

NICOLE PERUGINI STADTLOBER

**ASSOCIAÇÃO DOS MARCADORES DE ESTRESSE  
OXIDATIVO E DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES COM A  
PRESENÇA E ATIVIDADE DA NEFRITE LÚPICA**

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

### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S777a	<p>Stadtlober, Nicole Perugini. Associação dos marcadores de estresse oxidativo e de anticorpos antinucleares com a presença e atividade da nefrite lúpica. / Nicole Perugini Stadtlober. - Londrina, 2016. 82 f. : il.</p> <p>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.</p> <p>1. Lúpus eritematoso sistêmico. - Teses. 2. Nefrite lúpica. - Teses. 3. Autoanticorpos. - Teses. 4. Estresse oxidativo e nitrosativo. - Teses. I. Name Colado Simão, Andréa . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 616-092</p>
-------	---

NICOLE PERUGINI STADTLOBER

**ASSOCIAÇÃO DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO E DE  
ANTICORPOS ANTINUCLEARES COM A PRESENÇA E ATIVIDADE  
DA NEFRITE LÚPICA**

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, 08 de abril de 2016.

## AGRADECIMENTOS

À Deus por se fazer presente todos os dias, abençoando e iluminando meus caminhos.

À minha família pelos ensinamentos, valores e princípios.

Ao meu noivo, pelo companheirismo, carinho, paciência e incentivo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão, pela grande oportunidade que me foi confiada, pelo apoio e amizade, pelos valiosos conselhos, pela extrema dedicação e competência, pelo infinito conhecimento e pelo grande exemplo de mulher e profissional.

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

Ao Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy, pela participação nesta banca, pelo conhecimento que me foi passado na graduação, pelo incentivo a realizar o mestrado, e a importante indicação como orientanda à Profa. Dra. Andréa.

À Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, pelo grande conhecimento e contribuições para este trabalho.

À Profa. Dra. Elaine Delicato, pela atenção e amizade.

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 Tatiana Mayumi Veiga Iriyoda, pela fundamental participação no atendimento e direcionamento dos pacientes, pela constante ajuda, amizade e parceria.

À Francieli Delongui, pela amizade e paciência, pela importante ajuda na organização do banco de dados, no recrutamento de pacientes e na coleta de material biológico.

À Katerine Zanin e Sayonara Rangel, pela amizade, companheirismo e pelos ensinamentos práticos na realização das técnicas laboratoriais.

À Daniela Frizon Alfieri e Tamires Flauzino, pela grande amizade, pelo companheirismo diário, pelo compartilhamento de idéias, pelos conselhos e conversas, e pela valiosa contribuição prática.

Aos meu colegas do laboratório de Imunologia Aplicada, Bruna Miglioranza, Nayara Rampazzo e Renan Requena, pela considerável participação e colaboração neste trabalho.

Aos estagiários Beatriz, Caio e Natália, pela importante participação em algumas etapas deste trabalho, e por me permitirem compartilhar e repassar meus conhecimentos.

Por fim às minhas grandes amigas, Daniela, Tamires, Sayonara, Lorena, Bruna, pela excelente convivência, momentos de lazer e descontração, companheirismo e amizade.

STADTLOBER, Nicole Perugini. **Associação dos marcadores de estresse oxidativo e de anticorpos antinucleares com a presença e atividade da nefrite lúpica.** 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

## RESUMO

Nefrite lúpica (NL) é uma das complicações mais graves do lúpus eritematoso sistêmico (LES) e afeta quase dois terços dos pacientes durante o seu tempo de vida, sendo responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade. A patogênese da NL é um processo complexo que envolve a deposição de autoanticorpos nos glomérulos, ativação do sistema complemento, proliferação celular, produção de proteínas na matrix extracelular e liberação de citocinas inflamatórias. O estresse oxidativo e nitrosativo (EO&N) é um importante fator que participa da formação de autoantígenos por modificação oxidativa de biomoléculas, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, o que resulta no reconhecimento destas moléculas pelo sistema imune e consequente produção de autoanticorpos. Os anticorpos *anti-double-stranded-DNA* (anti-dsDNA) e anti-nucleossomo (anti-NCS) contribuem significativamente para a patogênese da NL, já que a heterogeneidade destes anticorpos implica em uma variedade de mecanismos patogênicos. Embora vários estudos tenham demonstrado o envolvimento destes autoanticorpos na NL, os dados ainda são controversos a respeito do seu exato papel na fisiopatologia da doença. Além disso, pouco se tem investigado sobre a participação do EO&N na fisiopatologia da NL e seu envolvimento na atividade da doença. **Objetivo:** avaliar se a associação dos anticorpos anti-dsDNA e anti-NCS e os biomarcadores de EO&N poderiam ser utilizados como indicadores de presença e atividade da NL. **Métodos:** foram selecionados 152 pacientes com LES sem nefrite e 48 com nefrite (36 em remissão e 12 em atividade). Todos os participantes foram avaliados clinicamente quanto ao sexo, etnia, índice de massa corporal (IMC), uso de medicamentos e outros dados clínicos e laboratoriais. Os testes imunológicos avaliados foram: pesquisa de anticorpos antinucleares (ANA) por imunofluorescência indireta, pesquisa de anticorpos anti-dsDNA e anti-NCS por ensaio imunoenzimático (ELISA) e dosagem dos componentes do sistema complemento, C3 e C4, por turbidimetria. Quanto aos biomarcadores de EO&N, foram avaliados: o perfil de estresse oxidativo por quimioluminescência induzida por tert-butil, produtos avançados de oxidação protéica (AOPP) por espectrofotometria, produtos de lesão oxidativa de DNA e RNA por ELISA, metabólitos de óxido nítrico (NOx) pelo método de Griess e a capacidade antioxidante total plasmática pela metodologia de TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*). Dados categóricos foram analisados pelo teste exato de Fisher ou o teste do Qui-quadrado, e os resultados expressos em números absolutos. As comparações entre o grupo LES com ou sem nefrite, e doença ativa e remissão, foram realizadas utilizando o teste t de Student. Os dados foram expressos como média ( $\pm$ SEM). Análise de regressão logística bivariada foi utilizada para definir a associação significativa de pacientes com nefrite em relação aos pacientes sem nefrite, e pacientes com doença ativa e em remissão, utilizando biomarcadores com  $p < 0,1$ . As correlações foram avaliadas pelo teste de Pearson. Foi considerada significância estatística quando  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SPSS 20.0. **Resultados:** quando comparados os grupos com e sem nefrite, não houve diferença significativa no gênero ( $p=0,815$ ), etnia ( $p=0,349$ ), tempo de duração da doença ( $p=0,981$ ), SLEDAI $\geq 6$  ( $p=0,932$ ), C3 ( $p=0,292$ ) e C4 ( $p=0,688$ ). Os níveis séricos de anticorpos anti-dsDNA ( $p=0,033$ ) e anti-NCS ( $p=0,002$ ), IMC ( $p<0,0001$ ) e o uso

de micofenolato ( $p=0,001$ ) foram maiores para o grupo com NL. Os pacientes com nefrite mostraram uma diminuição dos produtos avançados de oxidação protéica (AOPP,  $p=0,010$ ) e um aumento dos níveis de metabólitos de óxido nítrico ( $\text{NO}_x$ ,  $p=0,030$ ), quando comparado com o grupo sem nefrite. AOPP (OR: 0.984, IC 95%: 0.970-0.998,  $p=0,025$ ), anti-NCS (OR: 1.009, IC 95%: 1.001-1.018,  $p=0,036$ ) e IMC (OR: 1.161, IC 95%: 1.030-1.309,  $p=0,015$ ) foram associados à presença de NL, independentemente da idade. A inclusão do uso de micofenolato (OR: 0.034, IC 95%: 0.04-0.272,  $p=0,001$ ) ao modelo de regressão logística fez com que houvesse perda de associação entre a presença de NL e anti-NCS (OR: 1.004, IC 95%: 0.993-1.015,  $p=0,459$ ). No entanto, AOPP (OR: 0.973, IC 95%: 0.953-0.992,  $p=0,007$ ) e IMC (OR: 1.186, IC 95%: 1.018-1.382,  $p=0,029$ ) mantiveram-se independentemente associados à presença de NL. Quando os pacientes com nefrite foram divididos em doença em remissão e doenças ativa, não houve diferença significativa no gênero ( $p=1,000$ ), etnia ( $p=0,609$ ), idade ( $p=0,694$ ), IMC ( $p=0,924$ ), C4 ( $p=0,257$ ) e níveis séricos de anticorpos anti-dsDNA ( $p=0,877$ ) e anti-NCS ( $p=0,931$ ). No entanto, os pacientes com doença ativa apresentaram aumento de AOPP ( $p=0,022$ ) e diminuição de  $\text{NO}_x$  ( $p<0,0001$ ) em comparação com aqueles com doença em remissão. A AOPP (OR: 1.027; IC 95%: 1.000-1.055,  $p=0,046$ ) e  $\text{NO}_x$  (OR: 0.920; IC 95%: 0.847-0.999,  $p=0,049$ ) foram independentemente associados com a atividade da NL. O IMC foi positivamente correlacionado com os níveis de anticorpos anti-dsDNA ( $r=0,183$ ,  $p=0,016$ ) e anti-NCS ( $r=0,202$ ,  $p=0,022$ ). O perfil de estresse oxidativo demonstrou ser significativamente diferente ( $p<0,0001$ ) para pacientes com e sem NL, assim como entre NL ativa ( $p<0,0001$ ) e em remissão. **Conclusão:** os dados deste estudo demonstraram que a diminuição de AOPP e o aumento de anti-NCS e IMC estão associados com a presença de NL, enquanto que o aumento da AOPP e a diminuição dos níveis de  $\text{NO}_x$  foram independentemente associados com a atividade da NL. Desta forma, os anticorpos anti-NCS mostraram-se bons preditores da presença de NL, mas não de atividade da doença. A avaliação concomitante do EO&N e os anticorpos anti-NCS poderiam atuar como ferramentas úteis na identificação da NL e monitoramento da atividade da doença.

**Palavras-chave:** Lúpus eritematoso sistêmico. Nefrite lúpica. Anti-dsDNA. Anti-NCS. Estresse oxidativo. Óxido nítrico.

STADTLOBER, Nicole Perugini. **Association of oxidative stress markers and antinuclear antibodies in the presence and activity of lupus nephritis.** 2016. 82 f. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, Londrina. 2016.

## ABSTRACT

Lupus nephritis (LN) is one of the most serious complications of systemic lupus erythematosus (SLE) and affects almost two thirds of patients during their lifetime, accounting for high morbidity and mortality. The pathogenesis of LN is a complex process that involves the deposition of autoantibodies in the glomeruli, complement activation, cell proliferation, production of proteins in the extracellular matrix and release of inflammatory cytokines. Oxidative and nitrosative stress (O&NS) is a major factor that participates in the formation of autoantigens by oxidative modification of biomolecules such as proteins, lipids and nucleic acids (DNA and RNA). This results in the recognition of these molecules by the immune system and the consequent production of autoantibodies. The anti-double-stranded DNA (anti-dsDNA) and anti-nucleosome (anti-NCS) contribute significantly to the pathogenesis of LN, since the heterogeneity of these antibodies involves a variety of pathogenic mechanisms. Although several studies have demonstrated the involvement of these autoantibodies in the LN, the data is still controversial about their exact role in the pathophysiology of the disease. In addition, little has been investigated on the participation of the O&NS in the pathophysiology of NL and their involvement in disease activity. **Objective:** evaluate if the association of anti-dsDNA and anti-NCS and biomarkers of O&NS could be used as indicators of the presence and activity of LN. **Methods:** we selected 152 patients with SLE without nephritis and 48 with nephritis (36 in remission and 12 active). All participants were clinically evaluated in terms of gender, ethnicity, body mass index (BMI), use of medications and other clinical and laboratory data. The immunoassay tests were evaluated: research antinuclear antibodies (ANA) through indirect immunofluorescence detection of anti-dsDNA and anti-NCS antibodies by enzyme immunoassay (ELISA) and the dosage of complement components C3 and C4 by turbidimetrically. O&NS were evaluated: the profile of oxidative stress by chemiluminescence induced by tert-butyl, advanced products of protein oxidation (AOPP) by spectrophotometry, oxidative damage products of DNA and RNA by ELISA, nitric oxide metabolites (NO<sub>x</sub>) by the method of Griess and total plasma antioxidant capacity by TRAP methodology (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter). Categorical data were analyzed by Fisher's exact test or the chi-square test, and the results expressed in absolute numbers. Comparisons between the SLE group with or without nephritis, and active and remission disease were performed using t Student test. Data were expressed as mean ( $\pm$  SEM). Bivariate logistic regression analysis was used to define the significant association of patients with nephritis compared to patients without nephritis, and patients with active disease and remission using biomarkers with  $p < 0.1$ . Correlations were assessed using Pearson test. Statistical significance was considered at  $p < 0.05$ . All analyzes were performed using SPSS 20.0 program **Results:** comparing the groups with and without nephritis, there was no significant difference in gender ( $p=0.815$ ), ethnicity ( $p=0.349$ ), duration of the disease ( $p=0.981$ ), SLEDAI $\geq 6$  ( $p=0.932$ ), C3 ( $p=0.292$ ) and C4 ( $p=0.688$ ). Serum levels of anti-dsDNA antibodies ( $p=0.033$ ) and anti-NCS ( $p=0.002$ ), BMI ( $p<0.0001$ ) and use of mycophenolate ( $p=0.001$ ) were higher in the group with NL. Patients with nephritis showed a decrease in protein oxidation advanced product (AOPP,  $p=0.010$ ) and an increase of nitric oxide metabolites levels (NO<sub>x</sub>,  $p=0.030$ ) when compared with the group without nephritis.

AOPP (OR: 0.984, CI 95%: 0.970-0.998, p=0.025), anti-NCS (OR: 1.009, CI 95%: 1.001-1.018, p=0.036) and BMI (OR: 1.161, CI 95%: 1.030-1.309, p=0.015) were associated with the presence of LN, regardless of age. The inclusion of the use of mycophenolate (OR: 0.034, CI 95%: 0.04-0.272, p=0.001) to the logistic regression model resulted in the loss association between the presence of LN and anti-NCS (OR: 1.004, CI 95%: 0.993-1.015, p=0.459). However, AOPP (OR: 0.973, CI 95%: 0.953-0.992, p=0.007) and BMI (OR: 1.186, CI 95%: 1.018-1.382, p=0.029) remained independently associated with the presence of NL. When patients with nephritis were divided in remission and active disease, there was no significant difference in gender (p=1.000), ethnicity (p=0.609), age (p=0.694), BMI (p=0.924), C4 (p=0.257) and serum levels of anti-dsDNA antibodies (p=0.877) and anti-NCS (p=0.931). However, patients with active disease had increased AOPP (p=0.022) and decreased NOx (p<0.0001) compared to those with disease in remission. The AOPP (OR: 1.027; CI 95%: 1.000-1.055, p=0.046) and NOx (OR: 0.920; CI 95%: 0.847-0.999, p=0.049) were independently associated with the LN activity. BMI was positively correlated with the levels of anti-dsDNA antibodies (r=0.183, p=0.016) and anti-NCS (r=0.202, p=0.022). The profile of oxidative stress was shown to be statistically significant (p<0.0001) than among patients with and without NL, NL and between active (p<0.0001) and in remission. **Conclusion:** the data from this study demonstrated that the decrease in AOPP and increased anti-NCS and BMI are associated with the presence of LN, while the increase in AOPP and reduction of NOx levels were independently associated with NL activity. Thus, the anti-NCS antibodies showed to be good predictors of the presence of NL, but not for disease activity. Concomitant evaluation of O&NS and anti-NCS antibodies could be useful tools in the identification of NL and monitoring disease activity.

**Keywords:** Systemic Lupus Erythematosus. Lupus nephritis. Anti-dsDNA. Anti-NCS. Oxidative stress. Nitric oxide.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABAP	2,2-azobis (2-amidinopropano)
ANA	Anticorpo anti-nuclear
Arg	Arginina
AU	Ácido úrico
anti-DNA	Anticorpo anti-ácido desoxiribonucléico
anti-dsDNA	Anticorpo anti-ácido desoxiribonucléico dupla fita
anti-NCS	Anticorpo anti-nucleossomo
anti-RNA	Anticorpo anti-ácido ribonucléico
AOPP	Produtos Avançados da Oxidação Protéica
CAR	Colégio Americano de Reumatologia
CAT	Catalase
Cit	L-citrulina
CL-LOOH	Quimioluminescência iniciada por tert-butil-hidroperóxido
C3	Fator C3 do complemento
C4	Fator C4 do complemento
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzimaimunoensaio
eNOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
EO	Estresse oxidativo
EO&N	Estresse oxidativo e nitrosativo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
GPx	Glutathiona peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Radical peróxido de hidrogênio
IFN- $\alpha$	Interferon do tipo alfa
IMC	Índice de massa corporal
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 $\beta$	Interleucina do tipo 1beta
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico

LPO	Lipoperoxidação
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MDA	Malondialdeído
NL	Nefrite lúpica
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	Nitrito
NO <sub>3</sub>	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
NO <sub>x</sub>	Metabólitos do óxido nítrico
O <sub>2</sub>	Oxigênio Molecular
OH	Radical hidroxila
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxil
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
ONOO.	Peroxinitrito
8-OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
URL	Unidade relativa de luz
RNA	Ácido ribonucléico
RO <sup>-</sup>	Radical alcoxil
ROO <sup>-</sup>	Radical peroxila
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SO	Superóxido
SOD	Superóxido Dismutase
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral do tipo alfa
TRAP	Total radical-trapping antioxidant parameter
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento tipo beta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1	LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO (LES) .....	13
1.2	NEFRITE LÚPICA (NL).....	14
1.3	ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO NO LES E NL .....	10
1.4	ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	24
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	28
3.1	OBJETIVO GERAL.....	28
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	28
<b>4</b>	<b>CASUÍSTICAS E MÉTODOS</b> .....	29
4.1	DELINEAMENTO .....	29
4.2	MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS .....	29
4.3	DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS .....	29
4.4	DETERMINAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE EO&N .....	30
4.4.1	Quimioluminescência Iniciada por Tert-Butil Hidroperóxido (Cl-Looh).....	30
4.4.2	Determinação dos Produtos Avançados da Oxidação Protéica (AOPP).....	31
4.4.3	Produtos de Oxidação de DNA/RNA .....	31
4.4.4	Níveis de Metabólitos de Óxido Nítrico (NOx) .....	31
4.4.5	Capacidade Antioxidante Total do Plasma .....	32
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	33
5.1	ARTIGO.....	33
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	59
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	60
	<b>APÊNDICES</b> .....	69

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	69
APÊNDICE B – Ficha de avaliação dos pacientes .....	71
<b>ANEXOS</b> .....	<b>72</b>
ANEXO A – Escore SLEDAI - Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index .....	73
ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da Universidade Estadual de Londrina.....	74
ANEXO C – Instruções para autores da revista Immunobiology .....	77
ANEXO D – Comprovante de submissão de artigo.....	82

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)

O LES é uma doença autoimune inflamatória crônica e seu desenvolvimento é atribuído a fatores genéticos e ambientais em que há disfunção da resposta imune adquirida. No entanto, uma inadequada, ativa e sustentada resposta imune inata está implicada no início e nas consequências patogênicas da produção de autoanticorpos no LES (OATES, 2010).

A doença é caracterizada pela presença de autoanticorpos contra o núcleo celular que são denominados anticorpos antinucleares (ANAs). Os ANAs podem atuar contra diversas estruturas nucleares, entre elas o ácido desoxirribonucléico de dupla fita (anti-dsDNA), as proteínas histonas, as proteínas ligadas ao ácido ribonucléico (anti-RNA) e os antígenos nucleolares (KOTZIN; O'DELL, 1995; HAHN, 1998). A presença destes anticorpos gera lesões locais e sistêmicas, podendo afetar pele, articulações, rins, pulmões e o sistema nervoso central (URAMOTO et al., 1999).

O lúpus acomete preferencialmente o sexo feminino, ocorrendo em uma proporção de nove casos em mulheres, para um caso em homens. As mulheres acometidas estão normalmente entre 20 a 40 anos de idade, sendo a idade média de 30 anos. Há também uma maior prevalência em determinados grupos étnicos, como asiáticos, hispânicos e afrodescendentes (URAMOTO et al., 1999).

A incidência da doença ocorre com maior frequência no Sul da Europa (Itália e Espanha) e Norte da Austrália em comparação aos Estados Unidos e Japão, e a maioria dos dados epidemiológicos sobre o LES é proveniente de países como Estados Unidos e Europa (PETRI, 2000; NIGHTINGALE et al., 2006). A frequência da doença na população mundial é de aproximadamente 27,7/100 mil com variação de 15 a 120/100 mil (RUS; HOCHBERG, 2002; D'CRUZ; KHAMASHTA; HUGHES, 2007), podendo alcançar 400/100 mil em mulheres afro-americanas (HART et al., 1993). No Brasil, os dados sobre prevalência e incidência ainda são escassos, pois até o presente momento somente dois estudos avaliaram a incidência do LES no país. O primeiro estudo foi realizado na cidade de Natal-RN, e revelou uma incidência de 8,7/100mil/ano (VILAR; SATO, 2002). O segundo, realizado na cidade de Cascavel-PR, demonstrou uma incidência de 4,8/100mil/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, e também pela maior porcentagem de herança étnica e indivíduos negros se comparados com a população de Cascavel (NAKASHIMA et al., 2011).

As manifestações clínicas do LES podem variar de leve a grave, alternando períodos de atividade com períodos assintomáticos (URAMOTO et al., 1999). As manifestações mais comuns são as lesões cutâneas que ocorrem em cerca de 80% dos casos, com predominância de manchas avermelhadas na região malar e dorso do nariz, denominadas de lesões em asa de borboleta (VARGAS; ROMANO, 2009). Outras manifestações frequentes envolvem lesões articulares, inflamação dos rins, alterações neuropsiquiátricas e alterações sanguíneas. As lesões articulares ocorrem em 90% dos pacientes com consequente aparecimento de dor e inchaço nas articulações das mãos, punhos, joelhos e pés. As alterações neuropsiquiátricas são menos frequentes, no entanto podem ocasionar convulsões, alterações de comportamento e humor (GORDON, 2002). Quanto às células sanguíneas, as alterações mais características são a anemia hemolítica, a trombocitopenia e leucopenia. A anemia hemolítica é descrita em 7-15% dos pacientes com LES, a trombocitopenia ocorre em uma prevalência de 7-30%, e a leucopenia pode ocorrer em nível de linfócitos ou de neutrófilos, sendo as prevalências de 20-81% e 47%, respectivamente (SKARE; DAMIN; HOFIUS, 2015).

O envolvimento renal é um dos fatores mais preocupantes entre as manifestações do LES e pode ocorrer em mais de 50% dos pacientes. Caracterizado pela produção de autoanticorpos contra antígenos nucleares, perda da tolerância imunológica e lesão renal imuno-mediada. O mecanismo de lesão renal inicia-se por meio da deposição de complexos imunes no parênquima renal, que conduz à ativação do complemento e à indução dos processos inflamatórios e fibróticos. Assim, se a lesão renal não for diagnosticada e tratada de forma rápida e adequada, pode-se evoluir para uma insuficiência renal grave, sendo necessária a realização de diálise ou até mesmo transplante renal (CAMERON, 1999; YUNG et al., 2013).

## 1.2 NEFRITE LÚPICA (NL)

A NL é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com LES. 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 (LALWANI et al., 2015). A maioria dos pacientes desenvolve a NL já no início da doença, ocorrendo preferencialmente em pacientes com idade inferior a 55 anos. No entanto, também

pode se desenvolver em 30-80% dos pacientes pediátricos, demonstrando um perfil mais grave de lesão renal (SAXENA et al., 2011).

O diagnóstico da NL inclui a análise dos sedimentos da urina, padrão de excreção de proteína e creatinina, determinação dos níveis de creatinina no soro e avaliação de marcadores sorológicos como os títulos de anticorpos anti-dsDNA e níveis dos componentes do complemento, C3 e C4 (LALWANI et al., 2015). As alterações laboratoriais são variáveis, vão desde a sua ausência, até a presença de proteinúria ou sedimentos urinários ativos (hematúria, piúria ou elementos celulares). A proteinúria é a principal característica da doença renal, está presente em quase 100% dos pacientes e geralmente é associada ao desenvolvimento da síndrome nefrótica com rápida progressão para insuficiência renal aguda (MOK, 2012). A hematúria é encontrada em grande parte dos pacientes, nunca de forma isolada, mas associada à proteinúria. Normalmente a taxa de filtração glomerular apresenta-se reduzida e há uma significativa disfunção renal tubular em cerca de metade de todos os pacientes com NL (CAMERON, 1999; SAXENA et al., 2011).

A patogênese da NL embora não tenha sido totalmente elucidada, é um processo complexo que envolve múltiplos fatores, como perda da tolerância imunológica, deposição de autoanticorpos nos glomérulos, ativação do complemento, proliferação celular, produção de proteínas na matrix extracelular e liberação de citocinas inflamatórias. A associação destes fatores leva a uma cascata de eventos inflamatórios com consequente recrutamento de células T, macrófagos e células dendríticas que estão interligados por meio de diversos mecanismos que resultam em dano tubular, inflamação e fibrose (LI et al., 2013; BRITO et al., 2014).

A deposição do autoanticorpos nos glomérulos ocorre através da ligação com os antígenos aprisionados no parênquima renal e consequente formação de complexos imunes nos tecidos renais. Este processo tem sido constantemente avaliado como uma forma de ajudar a compreender o papel dos autoanticorpos na patogênese da NL, além de expandir as ferramentas de monitoramento e diagnóstico da doença (YAP; LAI, 2015).

Um biomarcador é considerado um produto biológico, bioquímico ou molecular que pode ser analisado quantitativamente e qualitativamente com o objetivo de determinar a atividade renal do LES, sua gravidade, e ainda monitorar as respostas terapêuticas. Assim, o biomarcador de NL deve possuir várias características, sendo que dentre elas se destacam: 1<sup>a</sup>) uma boa correlação com a atividade renal, refletido pelo grau de proteinúria e de sedimentos na urina; 2<sup>a</sup>) deve ser sensível às mudanças, apresentando capacidade de prever períodos de pico da doença, antes que as alterações nos parâmetros

clínicos se tornem evidentes; e 3<sup>a</sup>) ser específicos para NL em pacientes com LES de forma a ajudar no seu diagnóstico precoce (MOK, 2010).

Atualmente os marcadores laboratoriais utilizados para determinação da NL, como proteinúria, *clearance* de creatinina, relação urinária proteína/creatinina, anti-dsDNA e complemento são insatisfatórios, já que não apresentam boa sensibilidade e especificidade para diferenciar a atividade da doença e os danos renais. O dano renal pode ocorrer antes mesmo de a função renal estar prejudicada e antes que sejam detectadas quaisquer alterações nos parâmetros laboratoriais (MOK, 2010; MOK, 2016). A proteinúria persistente, por exemplo, pode não indicar uma inflamação contínua dos rins, mas sim atribuída a lesões crônica pré-existentes ou a lesões renais recentes que se formaram no decorrer da doença. (MOK, 2010). Conseqüentemente a biópsia renal permanece sendo o método padrão-ouro para fornecer informações sobre a classe histológica, o grau de atividade da doença e a cronicidade. No entanto, a biópsia é um método invasivo, contraindicado e não aceito por muitos pacientes. Além disso, a realização de repetidas biópsias renais na rotina, após o tratamento ou durante as crises, é impraticável. Desta forma, torna-se necessário a descoberta de novos biomarcadores que tenham maior sensibilidade e especificidade, e que possam determinar a atividade da doença, prever períodos ativos e monitorar as respostas terapêuticas e o progresso da doença (MOK, 2016).

Os anticorpos anti-dsDNA são altamente específicos para o LES, estão presentes em 70% dos pacientes (ISENBERG et al., 1985; RAHMAN; ISENBERG, 2008) e sua reatividade tem sido associada com a atividade da doença e com períodos de lesão renal (ter BORG et al., 1990). Os anticorpos anti-dsDNA apresentam uma grande heterogeneidade o que implica em uma variedade de mecanismos patogênicos. Dessa forma, tem sido sugerido que os anticorpos anti-dsDNA atuam como importantes biomarcadores e que contribuem significativamente com a patogênese da NL (WINFIELD et al., 1977; ter BORG et al., 1990; MOSTOSLAVSKY et al., 2001).

As principais características associadas à patogenicidade dos anticorpos anti-dsDNA incluem isotipo IgG, carga catiônica, alta afinidade por ligações com DNA de fita dupla e reatividade cruzada com diferentes componentes dos glomérulos como a laminina, o colágeno e os proteoglicanos de sulfato de heparina (CHAN et al., 2002). No entanto, o mecanismo real pelo qual os anticorpos medeiam a lesão renal ainda é controverso. Sugere-se que o aprisionamento não específico dos complexos imunes circulantes e consequente ativação do complemento não seriam suficientes para explicar a deposição dos complexos imunes nos rins (YUNG; CHAN, 2008). No geral, tem sido proposto que a localização

estratégica das células mesangiais no glomérulo, justapostas a capilares adjacentes, facilitem a interação com os complexos imunes, componentes do complemento e mediadores inflamatórios. Além disso, a ligação entre os anticorpos anti-dsDNA e as estruturas glomerulares parece ocorrer por meio de ligação direta dos anticorpos aos epítomos de reação cruzada, ou a partir da ligação indireta do DNA ao material da cromatina através do sulfato de heparina ou outras moléculas de superfície celular como o DNA, histonas e nucleossomos (CHAN et al., 2002).

Alguns anticorpos anti-dsDNA também podem permanecer na superfície das células e não penetrá-las, e assim participar da citotoxicidade mediada pelo complemento, ou serem internalizados para localizar no núcleo onde alterariam a síntese de proteínas e induziriam os processos de apoptose (DESHMUKH et al., 2006; YUNG; CHAN, 2008).

Os anticorpos anti-dsDNA podem se ligar as células mesangiais, células endoteliais, e células epiteliais do túbulo renal proximal para induzir a proliferação celular, a apoptose e os processos inflamatórios e fibróticos (YUNG et al, 2013). O mecanismo pelo qual os anticorpos anti-dsDNA são depositados no parênquima renal ainda não foi definido, mas três teorias foram evidenciadas. A primeira teoria sugere que os anticorpos anti-dsDNA reativos poderiam formar complexos imunes com DNA/nucleossomos liberados a partir das células apoptóticas, e que posteriormente se depositariam no rim e iniciariam a cascata inflamatória (DESHMUKH et al., 2006). A segunda teoria propõe a deposição de anticorpos anti-dsDNA através da reação com o DNA/nucleossomos, aprisionados na membrana basal glomerular. O aprisionamento só é possível devido às interações entre o DNA carregado negativamente e a membrana basal glomerular carregada positivamente. A terceira e última teoria baseia-se na interação entre os antígenos renais e os anticorpos anti-dsDNA, que reagem de forma cruzada com a alfa-actina, laminina e sulfato de heparina nos glomérulos renais (DEOCHARAN et al., 2002; GROOTSCHOLTEN et al., 2003; PISETSKY, 2004).

Embora exista uma correlação direta do LES com a presença de anticorpos anti-dsDNA, alguns estudos têm demonstrado uma discrepância dos níveis destes anticorpos com a presença de NL. No estudo realizado por Alba et al. (2003) foram avaliados diferentes populações de anticorpos em pacientes com LES e NL. Quase 99% dos pacientes com LES, com ou sem NL, demonstraram ser positivos para os anticorpos ANAs. Dos pacientes que apresentavam NL, 68% eram positivos para os anticorpos anti-dsDNA. Por outro lado, metade dos pacientes sem NL apresentaram anticorpos anti-dsDNA, demonstrando assim, que nem todos os anticorpos anti-dsDNA podem induzir a deposição de complexos imunes nos glomérulos e que outros anticorpos também podem estar envolvidos na patogênese da NL.

Além disso, a deposição de imunoglobulina também está intimamente relacionada com a ligação do DNA. Uma baixa afinidade do anticorpo para o DNA diminuiria a deposição glomerular e conseqüentemente o desenvolvimento da NL (DESHMUKH et al., 2006).

Embora historicamente a formação de anticorpos contra o DNA tenha sido considerada uma das principais características sorológicas encontradas no LES, nos últimos anos tornou-se claro que o nucleossomo também é um autoantígeno importante envolvido na condução do lúpus. Desta forma, alguns pesquisadores têm afirmado que os anticorpos anti-nucleossomo (anti-NCS) poderiam servir como um melhor marcador para o LES, uma vez que estão presentes em até 90% dos pacientes com LES (BRUNS et al., 2000; VAN BAVEL et al., 2008; MANSON et al., 2009; ZIVKOVIC et al., 2014).

Os nucleossomos representam um conjunto importante de autoantígenos no LES e apresentam alta afinidade pelos componentes da membrana basal glomerular e da matrix mesangial. Durante o desenvolvimento da NL é observada a deposição precoce de complexos imunes no parênquima renal, normalmente formados por anticorpos anti-dsDNA e o nucleossomo. A cascata de eventos decorrentes transforma a nefrite silenciosa em nefrite grave, com deposição de complexos imunes na membrana basal glomerular e subsequente proteinúria grave. A deposição destes complexos imunes podem então levar a ativação de células mesangiais e a produção de quimiocinas que irão atrair células efetoras como neutrófilos e macrófagos e desencadear mecanismos de lesão renal (KANAPATHIPPILLAI et al., 2013).

Acredita-se que a associação positiva dos anticorpos anti-NCS com o dano renal ocorra a partir da interação das cargas associadas à estrutura quaternária do nucleossomo e os epítomos alvos presentes no tecido renal. As histonas que constituem parte do nucleossomo apresentam carga catiônica, enquanto que a membrana basal glomerular apresenta carga aniônica, o que permite a interação entre eles (SIMÓN et al., 2004; VAN BAVEL et al., 2008).

O nucleossomo, em pacientes com LES, pode ser encontrado na circulação após liberação por células apoptóticas como resultado de um distúrbio nos mecanismos de apoptose ou por um defeito nos processos de limpeza (VAN BAVEL et al., 2008). Estes nucleossomos por serem facilmente reconhecidos pelas células B e T e por participarem diretamente do dano renal, apresentam um importante papel na fisiopatologia do LES (BIZARRO et al., 2012). Os anticorpos anti-NCS podem ser prontamente detectados em pacientes com LES e seus títulos se correlacionam com os escores de atividade da doença, o

que permite atuarem como importantes biomarcadores para diagnóstico e avaliação da atividade do lúpus. (SIMÓN et al., 2004; YUNG; CHAN, 2012).

Alguns estudos têm demonstrado que os anticorpos anti-NCS estão fortemente associados com o envolvimento renal, que seus títulos se correlacionam com períodos de complicações renais e que a frequência destes anticorpos é similar à frequência encontrada dos anticorpos anti-dsDNA (MOK, 2010). No entanto, a sensibilidade e a especificidade dos anticorpos anti-NCS em prever a NL, ou até mesmo os períodos ativos da doença, não demonstraram ser melhores quando comparados àquelas apresentadas pelos anticorpos anti-dsDNA (ONISHI et al., 2015).

Assim, alguns autores têm sugerido que a avaliação combinada dos anticorpos anti-dsDNA e anti-NCS possa ser um parâmetro valioso para prever os vários aspectos da NL, como prognóstico, cronicidade, resposta ao tratamento e períodos de atividade da doença (MOK, 2010; SUI et al., 2013, MISRA et al., 2015).

### 1.3 ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO NO LES E NL

O EO&N está diretamente associado ao desenvolvimento do LES, disfunção endotelial e atividade da doença (OATES, 2010). O EO&N é representado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) e diminuição das defesas antioxidantes. As espécies reativas podem modular a expressão de uma variedade de moléculas inflamatórias com consequente exacerbação da inflamação e dos danos teciduais (AHSAN et al., 2003; SHAH et al., 2010).

No intuito de promover proteção frente a processos oxidativos, o organismo desenvolveu um sistema de defesa antioxidante que tem a função de limitar os níveis intracelulares de espécies reativas e inibir ou reduzir os danos celulares e teciduais. Neste sistema de defesa podem-se destacar mecanismos como o impedimento da formação e ação das espécies reativas e o favorecimento do reparo e da reconstituição de estruturas biológicas lesadas (KOURY; DONANGELO, 2003; SHAMI; MOREIRA, 2004).

O sistema de defesa enzimático é composto por enzimas como Superóxido Dismutase (SOD), considerada a primeira linha de defesa contra radicais livres derivados do oxigênio, Catalase (CAT), responsável por catalisar a decomposição de peróxido de hidrogênio e Glutathione Peroxidase (GPx), que atua reduzindo hidroperóxidos lipídicos e não lipídicos. Estas enzimas, de modo geral, atuam controlando ou inibindo a formação das

espécies reativas envolvidas nas reações oxidativas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

O sistema de defesa não enzimático inclui compostos antioxidantes principalmente de origem dietética, como vitaminas, minerais, flavonóides e carotenóides. A vitamina C e o betacaroteno são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes que auxiliam os mecanismos de defesa contra os danos oxidativos (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Alguns estudos realizados com substâncias antioxidantes têm ressaltado a importância da utilização de nutrientes isolados no tratamento e na prevenção de doenças, entretanto a ação conjunta de diversas substâncias encontradas nos alimentos pode atuar na proteção celular e tecidual. O efeito cooperativo entre as vitaminas C e E, por exemplo, têm demonstrado uma efetiva inibição da peroxidação lipídica e um importante papel na proteção do DNA (GEY, 1998; BIANCHI; ANTUNES, 1999).

O desequilíbrio entre os fatores oxidantes e a capacidade de ação dos sistemas antioxidantes, promove uma alteração no estado redox e a modulação da expressão de uma variedade de moléculas do sistema imunológico e inflamatório (AHSAN et al., 2003; SHAH et al., 2010).

As espécies reativas que são produzidas durante o desequilíbrio redox são átomos ou moléculas altamente reativos que apresentam um ou mais elétrons não pareados na sua última camada eletrônica. São formados a partir de reações de oxirredução, nas quais uma molécula cede o elétron não pareado, oxidando-se, ou recebe o elétron de outra molécula, reduzindo-se. Dessa forma, as ERO e ERN ou provocam ou são resultados dessas reações de oxirredução. Os principais exemplos destas espécies são o oxigênio molecular ( $O_2$ ), radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ), ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical peroxil ( $ROO^\cdot$ ), radical alcóxil ( $RO^\cdot$ ) e óxido nítrico (NO) (HALLIWELL, 1991; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

As ERO e ERN são encontradas no organismo e produzidas a partir de mecanismos fisiológicos como a respiração, assim como, por mecanismos patológicos como a inflamação. Quando produzidos em proporções adequadas permite o cumprimento de funções biológicas relevantes como a produção de ATP, ativação de genes, indução de resposta mitogênica, papel de defesa durante processos de infecção e outros numerosos sistemas de sinalização celular. (SHAMI; MOREIRA, 2004; VALKO et al., 2007). Entretanto, quando produzidos em excesso como nos processos inflamatórios, podem gerar danos oxidativos em células e tecidos. Tal processo conduz a oxidação de biomoléculas como lipídios, carboidratos, proteínas e DNA, com consequente perda das funções biológicas e desequilíbrio homeostático (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

A cronicidade do EO&N e a oxidação das biomoléculas têm relevantes implicações no desenvolvimento de numerosas enfermidades crônicas, entre elas o LES, aterosclerose, diabetes, obesidade, transtornos neurodegenerativos, câncer e, também no processo de envelhecimento (DICHI et al., 2014).

A patogênese do LES é atribuída a fatores genéticos e ambientais, que cumulativamente levam a uma disfunção de linfócitos B e T e células dendríticas, resultando na formação de ANAs e na formação de complexos imunes contra DNA, RNA e proteínas. O processo inflamatório do LES promove um aumento de ERO e ERN que podem favorecer o desenvolvimento da doença, já que contribui diretamente com a disfunção de células imunes, com a produção de autoantígenos e com a reatividade de autoanticorpos (PERL et al., 2009; KYTTARIS; TSOKOS, 2004).

A produção excessiva de ERO e o estado redox alterado estão relacionados com a indução da disfunção mitocondrial em células T e com a promoção da depleção do ATP (GERGELY et al., 2002; PERL et al., 2009). A associação destes fatores contribui para a anormalidade nos mecanismos de apoptose gerando uma predisposição à morte celular por necrose que está diretamente relacionada com a produção e expansão de autoanticorpos e as manifestações clínicas apresentadas no LES (SHAH et al., 2014). Alguns estudos têm demonstrado que além das ERO estarem envolvidas na desregulação da apoptose ela também pode estar relacionada com o atraso nos mecanismos de limpeza dos restos apoptóticos. A permanência destes detritos celulares acaba por induzir a produção de ANAs e a ativação de macrófagos e células dendríticas com consequente produção de óxido nítrico (NO) e interferon do tipo  $\alpha$  (IFN-  $\alpha$ ). Assim, os atrasos nos mecanismos de limpeza prolongam a interação de ERO com os detritos celulares, geram novos epítomos que estimulam a formação de um amplo espectro de autoanticorpos e conduzem os processos inflamatórios e danos celulares (AHSAN et al., 2003; SHAH et al., 2011).

As ERO e ERN podem afetar diversas moléculas biológicas, incluindo DNA, RNA, colesterol, lipídeos, carboidratos e moléculas antioxidantes. As proteínas são importantes alvos das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio devido a sua abundância nos sistemas biológicos e a sua alta velocidade para a reação. As consequências do dano oxidativo às proteínas seriam a formação de proteínas carbonílica, formação da 3-nitrotirosina e a formação de proteína hidroperóxido. Desta forma, é possível avaliar o nível de oxidação total das proteínas no LES a partir da dosagem dos níveis destes compostos formados (ZHANG et al., 2009).

No entanto, o principal alvo para ERO são os lipídeos que compõem a membrana celular. Estes lipídeos são submetidos a um aumento do processo de lipoperoxidação (LPO) alterando as estruturas e a permeabilidade da membrana, e prejudicando as funções celulares. A identificação da LPO se dá pela análise do produto final da oxidação, o malondialdeído (MDA). Este composto se liga covalentemente às proteínas, gera neoepítomos que são reconhecidos pelo sistema imunológico e desencadeiam um processo autoimune (AHSAN et al., 2003; SHAH et al., 2011). A peroxidação lipídica também pode favorecer a adsorção de macrófagos ativados em regiões inflamatórias vasculares e possibilitar a formação de placas de ateroma, o que poderá contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (LINDAHL et al., 2000). Alguns estudos têm demonstrado um aumento nos níveis de MDA em pacientes com LES, indicativo do aumento da LPO e a possível relação com o EO&N (SCOFIELD, 2003; KURIEN; FROSTEGARD et al., 2005; BEN MANSOUR et al., 2010). Porém, os resultados são controversos, sendo necessários maiores esclarecimentos. O estudo realizado por Tewthanom et al. (2008), por exemplo, não demonstrou diferença nos níveis de MDA quando comparados pacientes com LES e pacientes controles. Uma justificativa fornecida pelos autores quanto a este dado conflitante foi que provavelmente a prednisona tenha influenciado na peroxidação lipídica nestes pacientes (KUONO et al., 1994).

A insuficiência renal crônica é associada a uma síndrome imuno-inflamatória multifatorial que ocorre no início do desenvolvimento da doença, piora com a sua progressão e culmina em terapias de diálise. Entre os mecanismos envolvidos nas desordens imuno-inflamatórias pode-se citar a desregulação do equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e seus inibidores e o aumento de oxidantes produzidos pelos fagócitos em face das defesas antioxidantes defeituosas, o que resultaria em um quadro de EO&N crônico e aumento do estado inflamatório (WITKO-SARSAT et al., 1996).

Pacientes urêmicos sofrem de uma desregulação do sistema imune caracterizado pela existência de um estado de imunodeficiência e ativação de células imunocompetentes, incluindo células T e monócitos. Sugere-se que os monócitos ativados derivados de citocinas pró-inflamatórias estejam envolvidos nestas desordens imunológicas. A presença de um estado inflamatório crônico também tem sido documentada em pacientes em fase terminal de doença renal e que são submetidos à terapia de hemodiálise. Isto se deve a constante ativação de neutrófilos e monócitos circulantes através da passagem do sangue pelos circuitos de diálise e consequente geração de componentes ativados do complemento. Este processo leva a uma massiva geração de espécies reativas de oxigênio ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $^1O_2$ ,

OH<sup>-</sup>), assim como ao aumento da produção de citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) por monócitos ativados (WITKO-SARSAT et al., 1998).

As proteínas tornam-se importantes alvos dos danos oxidativos, já que são os principais componentes presentes na maioria dos tecidos, células, plasma e por apresentarem uma rápida taxa de reação com muitas substâncias oxidantes. As proteínas oxidadas são conhecidas por causar relevantes perturbações fisiológicas, como perda da estrutura ou da função, assim como por participar do controle do remodelamento e crescimento celular. Por conta da sua longa duração e das baixas taxas de remoção estas proteínas oxidadas podem tornar-se valiosos marcadores de EO&N em inúmeras condições patológicas (DEAN et al., 1997; MORGAN et al., 2005).

No estudo realizado por Morgan et al. (2005) foi verificado uma elevação na oxidação das proteínas por meio dos níveis de proteínas carbonílicas, sulfóxido de metionina e 3-nitrotirosina e uma redução correspondente no estado antioxidante demonstrada pela quantidade de proteínas tiol em pacientes com LES. Foram relatados que vários produtos da oxidação protéica relacionavam-se com o SLEDAI e com a presença de anticorpos anti-dsDNA. A metodologia utilizada foi a de produtos avançados da oxidação protéica (AOPP) que resulta da oxidação de aminoácidos como a tirosina e conduz à formação de produtos de proteínas de reticulação compostas por ditirosina e detectados por espectrofotometria (WITKO-SARSAT et al., 1998; LOZOVYOY et al., 2011).

Outros estudos verificaram que as concentrações plasmáticas de AOPP aumentaram significativamente com a progressão da disfunção renal em pacientes com diversas doenças renais crônicas. *In vivo*, os níveis plasmáticos de AOPP correlacionaram-se com os níveis de ditirosina, resultado da oxidação de proteínas, e com a pentasodina, um marcador da glicação enzimática e que está diretamente relacionado com o estresse oxidativo (EO). Assim, AOPP pode ser formada durante os processos de EO por meio da reação das proteínas plasmáticas com oxidantes clorados (WITKO-SARSAT et al., 1996; LI et al., 2007).

O acúmulo crônico da AOPP, como nas doenças renais crônicas, pode constituir uma nova base molecular para aumentar o EO&N que por sua vez desempenha um papel importante na progressão das doenças renais. Li et al., (2007) forneceu em seu estudo três linhas de evidências *in vivo* para os efeitos pró-inflamatórios da AOPP no tecido renal. Primeiro, a cronificação da AOPP aumenta a infiltração de macrófagos nos rins e, embora o mecanismo pelo qual as células causem a fibrose seja incerto, a maioria dos relatos sugere que a própria infiltração dos macrófagos promove a fibrose renal. Segundo, a AOPP regula positivamente a expressão da quimiocina pró-inflamatória MCP-1 (proteínas quimiotáticas de

monócitos-1) e a sua superexpressão parece estar associada com a inflamação celular e a atividade miofibroblástica no parênquima renal. Terceiro, a AOPP aumenta a expressão de TGF- $\beta$ 1, fator de crescimento fibrogênico, que desempenha um importante papel na patogênese da inflamação e na fibrose renal (Li et al., 2007).

Outro fator envolvido com a AOPP nos processos inflamatórios seria a sua participação nos mecanismos de ativação dos monócitos. No estudo realizado por Witko-Sarsat et al. (1998), várias evidências fornecidas sugerem forte relação entre os níveis de AOPP e os marcadores séricos de ativação de monócitos e, conseqüentemente, demonstram a importância da AOPP como uma nova classe de mediadores pró-inflamatórios e sua atuação como mediador do EO&N e ativação de monócitos. Portanto os monócitos são, ao mesmo tempo, alvos celulares da AOPP e fontes oxidantes induzindo AOPP (WITKO-SARSAT et al., 1998).

De forma resumida, o acúmulo de AOPP pode aumentar o EO e a inflamação, que por sua vez pode aumentar ainda mais a formação de AOPP pela estimulação de leucócitos para a produção de mais oxidantes. A repetitividade deste ciclo poderia ampliar ou manter o desequilíbrio da reação redox e do estado inflamatório e assim promover intensa lesão renal. No entanto, mais estudos são necessários para o entendimento real do papel da AOPP na inflamação renal e no EO&N, já que existem poucas evidências de que a AOPP contribua para a progressão das doenças renais (WITKO-SARSAT et al., 1998; LI et al., 2007).

#### 1.4 ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O NO é uma importante molécula de sinalização envolvida na manutenção da função vascular, sendo responsável por promover efeitos benéficos na vasculatura como a vasodilatação, inibição da adesão de leucócitos, migração e proliferação celular e agregação plaquetária (PORRO et al., 2014).

O NO é sintetizado a partir da oxidação do amino ácido L-arginina (Arg) à NO gasoso e L-citrulina (Cit) através de uma enzima conhecida como NO sintetase (NOS). O NO também é produzido por células endoteliais por meio da expressão de dois tipos desta enzima, a enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e a iNOS. A eNOS está presente normalmente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas, já a iNOS é induzida após a ativação de macrófagos, células endoteliais e várias outras células. O aumento na expressão da iNOS é capaz de produzir até 1.000 vezes mais NO do que a eNOS, e uma vez que a iNOS

esteja expressa ela irá produzir NO por longos períodos de tempo (MONCADA et al., 1991; NATHAN, 1997).

O NO tem a capacidade de induzir tanto efeitos fisiológicos como também efeitos patológicos, sendo assim o efeito da produção de NO nos processos celulares é em grande parte dependente de suas concentrações e da presença local de outros radicais livres. Concentrações baixas de NO apresentam um efeito direto nos processos fisiológicos como a proliferação e a sobrevivência das células, enquanto que concentrações elevadas apresentam um efeito indireto por meio do EO&N (ESPEY et al., 2002; OATES, 2010).

O aumento dos níveis de NO, quando em condições de estímulo, como no EO&N, no dano tecidual, e na presença de citocinas pró-inflamatórias, ocorre através do aumento da expressão de iNOS. Uma vez que sua expressão está aumentada, a iNOS irá aumentar a produção de NO que por sua vez irá mediar uma resposta inflamatória e promover disfunção vascular com conseqüente contribuição para a disfunção de linfócitos T. Alguns estudos demonstram que há um aumento na produção de NO endógeno em pacientes com LES, o que reforça a hipótese de envolvimento do NO na disfunção endotelial (GUNNETT et al., 2003; NAGY et al., 2010).

O EO apresenta um papel fundamental na determinação da biodisponibilidade do NO em decorrência da oxidação dos cofatores e enzimas envolvidas no metabolismo do NO ou pela inativação direta do NO. As células endoteliais são consideradas as principais fontes de NO na vasculatura, no entanto, foi demonstrado que as células circulantes (plaquetas, monócitos e células vermelhas do sangue) também podem contribuir com a síntese de NO (PORRO et al., 2014).

No decorrer da atividade do LES há uma produção significativa de NO. Seu papel patogênico encontra-se em grande parte na sua própria produção e sua proximidade com a síntese de ERO, como no caso da síntese de superóxido (SO). Uma vez que o NO e o SO reagem, há a formação de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), uma molécula mais reativa e com maior potencial patogênico (OATES; GILKESON, 2006). Entretanto, a concentração de NOx em pacientes com LES tem demonstrado resultados contraditórios; alguns autores relatam o aumento dos níveis (BELMONTE et al., 1997; WANCHU et al., 2001), enquanto outros não identificaram qualquer alteração nos níveis deste metabólito (WIGAND et al., 1997; GONZALEZ-CRESPO et al., 1998).

A produção de NO atua como um importante fator antimicrobiano presente na resposta imune inata (OATES et al., 2008). Em muitos estudos realizados em modelos animais têm-se observado que a produção de NO aumenta com a progressão das doenças renais e que a inibição farmacológica da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), com inibidores não específicos, tem diminuído significativamente a produção de NO, intermediários reativos de oxigênio, proteinúria e também as lesões inflamatórias nos glomérulos. Os resultados sugerem que a atividade da iNOS e de seus produtos, como o superóxido e o NO, contribuem para a proliferação das lesões glomerulares neste modelo animal de NL (WEINBERG et al., 1994; REILLY et al., 2002; OATES; GILKESON, 2006).

Estudos observacionais longitudinais demonstraram uma maior produção de marcadores de NO sistêmico em pacientes com LES e NL proliferativa do que naqueles com doença renal não proliferativa ou aqueles com LES, porém sem nefrite. Os pacientes com doença renal que não responderam à terapia, apresentaram níveis séricos significativamente mais elevados de metabólitos de óxido nítrico (NOx) nos primeiros três meses de terapia do que aqueles que alcançaram a resposta terapêutica (OATES et al., 2008). Este resultado sustenta a hipótese de que a produção de ERO e ERN aumentam os danos renais em pacientes com NL (OATES et al., 2008; OATES, 2010). No estudo longitudinal realizado por OATES et al. (2008), foi avaliada a associação de marcadores da produção de NO com a atividade da doença em pacientes com LES e NL. A partir dos resultados obtidos foi possível determinar esta associação de forma significativa através do aumento dos níveis séricos de NOx durante a ativação do complemento e durante o início da glomerulonefrite. Semelhantemente ao estudo realizado em modelos animais, também foi possível correlacionar o aumento dos níveis de NO com a proteinúria e que o aumento da produção de NO demonstrou ocorrer em paralelo, ou até mesmo preceder o início da proteinúria (REILLY et al., 2002).

## **2 JUSTIFICATIVA**

Os dados na literatura a respeito do envolvimento dos autoanticorpos nucleares (anti-dsDNA e anti-NCS) na atividade da NL ainda são controversos. Além disso, poucos estudos avaliaram o perfil redox em pacientes com NL e seu envolvimento com a atividade da doença. Não é de nosso conhecimento, até o presente momento, estudos que tenham avaliado concomitantemente a associação do EO&N e autoanticorpos nucleares, com a NL e a atividade da doença.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação entre os autoanticorpos nucleares e os biomarcadores de EO&N com a presença e atividade da NL.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar os níveis séricos de anticorpos anti-dsDNA e anti-NCS em pacientes com LES, na presença ou não de NL, e em atividade ou remissão.
- b) Comparar os níveis plasmáticos de biomarcadores de EO&N em pacientes com LES, na presença ou não de NL, e em atividade ou remissão.
- c) Avaliar se os marcadores de EO&N e os anticorpos anti-dsDNA e anti-NCS poderiam ser utilizados como preditores de NL e de sua atividade.

## 4 CASUÍSTICAS E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO

Um total de 200 pacientes com LES, de ambos os sexos e com idade entre 18 e 69 anos, foram selecionados do Ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário de Londrina, Paraná, Brasil, e convidados a participarem deste estudo transversal. O diagnóstico do LES foi realizado a partir dos critérios revisados do American College of Rheumatology (ACR) 1997 (HOCHBERG, 1997) e a atividade da doença foi determinada através da utilização SLE Disease Activity Index (SLEDAI).

Os pacientes selecionados foram divididos em dois grupos, com (n=48) e sem (n=152) NL. A NL foi diagnosticada baseada na presença de proteinúria ( $\geq 0.5\text{g}/24\text{h}$ ), e/ou hematúria, ou achado de sedimentos patológicos na urina, com ou sem aumento nos níveis de creatinina (SUI et al., 2013). Posteriormente estes pacientes foram subdivididos em dois grupos, nefrite em remissão (n=36) e nefrite ativa (n=12). A nefrite ativa foi considerada quanto à presença de hematúria, aumento de proteinúria ou aumento nos níveis séricos de creatinina (OATES, 2008).

Informações quanto aos fatores de estilo de vida e a história médica foram obtidas a partir da avaliação clínica. Duração do tratamento, níveis séricos de anticorpos anti-dsDNA e anti-NCS, drogas anti-inflamatórias, corticóides, antimaláricos, EO&N foram relatados para cada paciente. Foram excluídos do estudo, pacientes com outras doenças associadas, como doença cardíaca, tireoidiana, hepática, gastrointestinal, infecciosa ou oncológica, utilização de terapia para reposição hormonal e suplementos antioxidantes. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido, e o protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, sob parecer nº 205.328 (Anexo B).

### 4.2 MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

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 índice de massa corporal foi calculado como peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado. A

circunferência abdominal foi medida com uma fita suave na região entre a última costela e a crista ilíaca, sempre com os indivíduos na posição em pé.

#### 4.3 DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS E IMUNOLÓGICOS

Após jejum de 12h, o sangue coletado dos pacientes foi submetido às seguintes análises laboratoriais: os níveis de ácido úrico (AU) foram determinados por auto-analisador bioquímico (Dimension AR Dade Behring, EUA), utilizando kits Dade Behring® e os níveis séricos dos fatores do complemento C3/C4 foram avaliados por ensaio turbidimétrico (C800, Architect Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Os anticorpos anti-dsDNA e anti-NCS foram determinados por teste imunoenzimático (ELISA), utilizando um imunoensaio de ELISA comercial (INOVA Diagnostic, San Diego, CA, EUA), e considerados teste positivo quando os resultados obtidos foram  $\geq 20$ UI/mL.

#### 4.4 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE EO&N

Para avaliar o EO e a capacidade antioxidante total foram utilizadas amostras colhidas com EDTA como anticoagulante e antioxidante. Para a coleta foram utilizados tubos coletores com uma concentração de anticoagulante padrão (0,5 mL de EDTA para cada 4,5 mL da amostra de sangue). As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 min e armazenadas em alíquotas de plasma e soro à temperatura de -70° C até serem utilizadas nos ensaios laboratoriais.

##### 4.4.1 Quimioluminescência Iniciada por Tert-Butil-Hidroperóxido (CL-LOOH)

A determinação de CL-LOOH foi realizada conforme descrito por Flecha et al. (1991) e adaptado pelo nosso grupo de pesquisa (LOZOVY et al, 2011). Essa técnica tem como objetivo analisar a integridade dos mecanismos de defesa antioxidante não-enzimáticos e os níveis de hidroperóxidos. Este teste baseia-se no pressuposto de que um aumento na quimioluminescência está relacionado com o EO prévio sofrido pelo tecido, levando ao consumo das defesas antioxidantes de baixo peso molecular, como a vitamina E, e formação de lipoperóxidos, resultando em um aumento na emissão de fótons. Diferenças na inclinação da curva refletem diferenças na quantidade de antioxidantes presentes em cada

amostra, enquanto que a emissão elevada de fótons reflete uma maior quantidade de lipoperóxidos produzidos previamente nas amostras (SIMÃO et al., 2006).

Assim os resultados foram expressos por dois modos diferentes: a) como uma média das leituras efetuadas após a reação de uma hora, o que reflete os níveis de hidroperóxidos lipídicos pré-formados em uma amostra e expressos em unidade relativa de luz (URL) (LOZOVYOY et al., 2011) b) e como uma curva, o que demonstra a reação cinética no mesmo período (SIMÃO et al, 2006; SIMÃO et al, 2008).

#### 4.4.2 Determinação Dos Produtos Avançados Da Oxidação Protéica (AOPP)

Os níveis plasmáticos de AOPP foram determinados de acordo com o método de Witko-Sarsat et al. (1998). A técnica baseia-se na formação de produtos de oxidação de proteínas por ação de agentes oxidantes e posterior reação destes produtos de oxidação com o iodeto de potássio em meio ácido. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro termostaticado de duplo feixe (Thermo Spectronic ® modelo Hélios-  $\alpha$ , Waltham, MA, EUA). As concentrações encontradas foram expressas em  $\mu\text{mol/L}$  de equivalente de cloramina.

#### 4.4.3 Produtos de Oxidação de DNA/RNA

Este ELISA (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA) para a medição de danos oxidativos de DNA/RNA, detecta todas as três espécies de guanina oxidada; 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina a partir do DNA, 8-hidroxiguanosina a partir do RNA, e 8-hydroxyguanine do DNA ou RNA. As concentrações de produtos de oxidação de DNA/RNA foram expressas em  $\text{pg/mL}$ .

#### 4.4.4 Níveis de Metabólitos de Óxido Nítrico (NOx)

Os níveis séricos de NOx foram avaliados com base nas concentrações de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) de acordo com a reação de Griess, suplementado pela redução de nitrato a nitrito com cádmio (GUEVARA, 1998; NAVARRO, 1998). Os resultados dos níveis de NOx são relatados como  $\mu\text{M}$ .

#### 4.4.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO PLASMA

A capacidade antioxidante total plasmática foi avaliada pela metodologia de TRAP (*total radical-trapping antioxidant parameter*) de acordo com o método descrito por Reppeto et al. (1996). Este método detecta antioxidantes hidrossolúveis de plasma e/ou lipossolúveis por medição do tempo de inibição de quimiluminescência induzida por 2,2-azobis (2-amidinopropano) (ABAP). A vitamina E solúvel (Trolox) foi utilizada como o antioxidante de referência e a solução de luminol foi utilizada como amplificador da reação. Medidas de TRAP em condições associadas com hiperuricemia, como na NL, podem ser imprecisas porque a concentração de ácido úrico é responsável por 60% da capacidade total antioxidante do plasma. Deste modo, uma correção de TRAP com base na concentração de ácido úrico foi realizada e os resultados de TRAP corrigidos pelo valor de ácido úrico. As concentrações de TRAP foram expressas em  $\mu\text{M}$  Trolox por miligrama de ácido úrico ( $\mu\text{M}$  Trolox/mg AU) (SIMÃO et al., 2008; VENTURINI et al., 2012).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados categóricos foram analisados pelo teste exato de Fisher ou o teste do Qui-quadrado, quando apropriado. Números absolutos foram demonstrados como resultados. O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade de distribuição das variáveis. As transformações logarítmicas ( $\text{Ln}$ ) de dados contínuos (IMC, C3, anti-dsDNA, anti-NCS, AOPP e  $\text{NOx}$ ) foram utilizadas nas análises quando as variáveis não apresentaram distribuição normal. As comparações entre o grupo LES com ou sem nefrite, e doença ativa e remissão, foram realizadas utilizando o teste t de Student. Os dados foram expressos como média ( $\pm\text{SEM}$ ). Os resultados das análises estatísticas univariadas foram utilizados para delinear as variáveis explicativas significativas a serem utilizadas como determinantes de associação independente com os grupos de diagnóstico em posteriores análises de regressão logística. Análise de regressão logística bivariada foi utilizada para definir a associação significativa de pacientes com nefrite em relação aos pacientes sem nefrite, e pacientes com doença ativa e em remissão, utilizando biomarcadores com  $p < 0,1$ . As correlações foram avaliadas pelo teste de Pearson. Foi considerada significância estatística quando  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas com o programa SPSS 20.0 (SPSS, Chicago, IL, EUA).

## 5 RESULTADO

Como resultado desta dissertação, foi submetido para publicação no periódico *Immunobiology*, o artigo intitulado: **Oxidative and nitrosative stress and autoantibodies are associated with lupus nephritis.**

### 5.1 Artigo

#### **Oxidative and nitrosative stress and autoantibodies are associated with lupus nephritis.**

Nicole Perugini Stadtlober<sup>1</sup>, Tatiana Mayumi Veiga Iriyoda<sup>2</sup>, Francieli Delongui<sup>1</sup>, Beatriz Sardinha Sabino<sup>1</sup>, Marcell Alysson Batisti Lozovoy<sup>3</sup>, Neide Tomimura Costa<sup>2</sup>, Edna Maria Vissoci Reiche<sup>3</sup>, Isaias Dichi<sup>4</sup>, Andréa Name Colado Simão<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Research Laboratory of Immunology - University Hospital from University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Rheumatology - University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology - University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Internal Medicine - University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

**Corresponding author:** Andréa Name Colado Simão, PhD. Department of Clinical Pathology. Robert Koch Avenue nº 60 Bairro Cervejaria, University of Londrina. Londrina, Paraná, Brazil. CEP: 86038-440 Tel: (55) 43 3371-2321 Fax: (55) 43 3371-2619 e-mail: deianame@yahoo.com.br

### **Abbreviations**

ABAP, 2,2-azobis (2-amidinopropane); ANA, antinuclear antibodies; UA, uric acid; Anti-dsDNA, anti-double stranded DNA antibodies; Anti-NCS, Anti-nucleosome antibodies; AOPP, Advanced Oxidation of Protein Products; ACR, American College of Rheumatology; CL-LOOH, tert-butyl-hydroperoxide-initiated chemiluminescence; C3, complement factor C3; C4, Complement factor C4; DNA, deoxyribonucleic acid; EDTA, acid etilen diamino tetraacetic acid; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; OS, oxidative stress; O&NS, oxidative and nitrosative stress; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radical hydrogen peroxide; BMI, body mass index; SLE, systemic lupus erythematosus; LN, lupus nephritis; NO, nitric oxide; NO<sub>x</sub>, nitric oxide metabolites; OH<sup>•</sup>, hydroxyl radical; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superoxide anion radical; ONOO<sup>•</sup>, peroxynitrite; 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; RNA, acid ribonucleic; SLEDAI, systemic lupus erythematosus disease activity index; TRAP, total radical-trapping antioxidant parameter.

## ABSTRACT

**Objective:** To determine which parameters of oxidative and nitrosative stress (O&NS), and anti-dsDNA and anti-NCS antibodies were associated with the presence of lupus nephritis (LN) and its activity. **Methods:** We selected 152 patients with systemic lupus erythematosus (SLE) without nephritis and 48 with nephritis (36 in remission and 12 in activity). **Results:** Patients with LN had higher serum levels of anti-dsDNA (p=0.033) and anti-nucleosome (anti-NCS) antibodies (p=0.002). Patients with nephritis showed decreased advanced oxidation protein products (AOPP, p=0.010) and increased nitric oxide metabolites (NO<sub>x</sub>, p=0.030) compared to the group without nephritis. AOPP, anti-NCS antibodies, and BMI were associated to LN independently of age. However, anti-NCS antibodies lacked the association with LN when the results were controlled for mycophenolate use (OR: 1.004, CI 95%:0.993-1.015, p=0.459), whereas AOPP (OR: 0.973, CI 95%: 0.953-0.992, p=0.007) and BMI (OR: 1.186, CI 95%: 1.018-1.382, p=0.029) maintained their significance. When patients with nephritis were divided into in remission and in active disease, the later patients had increased AOPP (p=0.022) and decreased NO<sub>x</sub> (p<0.0001) compared to those in remission. AOPP was directly and independently (OR: 1.027, CI 95%: 1.000-1.055, p=0.046) and NO<sub>x</sub> was inversely and independently (OR: 0.920, CI 95%: 0.847-0.999, p=0.049) associated with LN activity. **Conclusion:** Increased protein oxidation can be an indication of renal activity in lupus patients. Anti-NCS antibodies showed to be good predictors of LN but

not of its activity. The concomitant evaluation of O&NS and anti-NCS antibodies are useful tools in identifying and monitoring disease activity in LN.

**Keywords:** Systemic Lupus Erythematosus. Lupus nephritis. Anti-dsDNA. Anti-NCS. Oxidative stress. Nitric oxide.

## INTRODUCTION

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease characterized by generation of autoantibodies particularly against components in the cell nucleus (Gutiérrez-Adriánzén et al., 2006). An inadequate active and continuous innate and immune response is involved in the pathogenic consequences of autoantibody production in SLE, which could affect any part of the body including heart, joints, skin, lungs, liver, nervous system and kidneys (Uramoto et al., 1999; Oates, 2010). Although SLE pathophysiology is multifactorial, a growing body of evidences has shown that activated immune-inflammatory response and oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways play an important role in this process, favoring their development and complications (Lozovoy et al., 2011; Lozovoy et al., 2013). Reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively) can attack all cellular biomolecules, including deoxyribonucleic acid (DNA), ribonucleic acid (RNA), lipids and proteins. Post-translational oxidative modifications of self-antigen may lead to the generation or unmasking of epitopes, resulting in the triggering of an autoimmune response (Ohmori and Kanayama, 2015).

Lupus Nephritis (LN) is one of the most serious complications of SLE affecting almost two-thirds of patients during their lifetime and it is responsible for high rates of morbidity and mortality (Moroni et al., 2015). It is characterized by the production of high titers of antinuclear antibodies, especially antibodies against dsDNA and nucleosome leading to immune-mediated injury in the glomerular, vascular, and tubulointerstitial compartments of the kidney (Yung et al., 2012; van Bavel et al., 2008).

Although its clinical significance, studies on O&NS in LN are still scarce in the literature. Most articles report that increased oxidative stress and inflammation are common features of patients with renal involvement. (Witko-Sarsat et al., 1996; Witko-Sarsat et al., 1998; Li et al., 2007; Fan et al., 2015). However, the great majority of reported studies observed the association of oxidative stress with pathogenesis and disease activity of SLE but not

specifically with LN (Lozovoy et al., 2011; Shah et al., 2014; Morgan et al., 2005). Oates et al. (2008) have shown an increase of nitric oxide (NO) in patients with LN compared to patients without LN, however there was no difference between patients with LN in activity or in remission (Oates et al., 2008).

A range of evidence from clinical (Cortés-herández et al., 2004; Manson et al., 2009), and animal (Mostoslavsky et al., 2001) studies suggested that anti-dsDNA antibodies were the main autoantibodies involved in the pathogenesis of LN. Anti-dsDNA antibodies can bind to mesangial cells, endothelial cells, and proximal renal tubular epithelial cells to induce cell proliferation, apoptosis, and inflammatory and fibrotic processes (Yung et al., 2013). In addition, anti-nucleosome (anti-NCS) antibodies have also been detected in SLE patients, particularly in patients with renal flare (Simón et al., 2004; Gómez-puerta et al., 2008). Some authors have proposed that the nucleosome is the principal antigen in the pathophysiology of SLE, and play a central role in the antinuclear antibody response (Simón et al., 2004; Gómez-puerta et al., 2008). There is strong evidence that the nucleosome is both the driving immunogen and the target of lupus anti-dsDNA and anti-histone antibodies. Anti-NCS antibodies are associated with renal involvement in some studies and their titers correlate with SLE disease activity scores (Amoura et al., 2000; Cervera et al., 2003; Mok, 2010). The frequency of these antibodies in active lupus is similar to that of anti-dsDNA antibodies, and their titles correlate with each other (Mok, 2010). However, the correlation of these autoantibodies with disease activity and renal involvement remains controversial needing further investigation (Zivkovic et al., 2014).

Although conventional parameters such as creatinine clearance, proteinuria, urine sediment, serum C3 and C4 levels and anti-dsDNA antibodies titers have for decades been used to follow the onset, course and severity of LN, they are not specific enough to detect disease activity in renal involvement and nephritis relapse (Zivkovic et al., 2014; Liu et al., 2013). Hence, others biomarkers are being proposed to predict renal involvement before clinical manifestations (Gutiérrez-adrianzén et al., 2006; Simón et al., 2004). These novel biomarkers should be able to make a precise diagnosis, assess disease activity, discriminate its severity, predict renal flares and monitor treatment response and disease progress (Mok, 2010; Liu et al., 2013).

Considering that O&NS as well as anti-dsDNA and anti-NCS antibodies are involved in the SLE and nephritis pathophysiology, the first aim of this study was to determine which parameters of O&NS were associated with the presence of LN and which O&NS tests could

be used to determine disease activity. The second aim was to evaluate anti-dsDNA and anti-NCS in LN patients.

## **SUBJECTS AND METHODS**

### *Subjects*

Two hundred patients with SLE, of both sexes, aged 18 to 69 years were selected from 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) and the disease activity was determined using SLE Disease Activity Index (SLEDAI) score (Hochberg, 1997). SLE patients were divided into two groups based on the presence (n=152) or absence (n=48) of LN. LN was diagnosed based on the presence of proteinuria ( $\geq 0.5\text{g}/24\text{h}$ ), and/or hematuria, or pathological finding in the urine sediment, with or without an increase in creatinine levels (Sui et al., 2013). Thereafter, patients with LN were subdivided in two groups, remission (n=36) and active disease (n=12). The active LN was considered when hematuria, increasing proteinuria or an increasing serum creatinine levels was present (Oates et al., 2008).

Information about lifestyle factors and medical history were obtained at clinical evaluation. Disease duration, serum levels of anti-dsDNA and anti-NCS antibodies, and anti-inflammatory, corticosteroids, and antimalarial drugs were recorded for each patient. None of the participants in the study presented heart, thyroid, hepatic, gastrointestinal, or oncological diseases and none had a clinically evident infection or was receiving estrogen replacement therapy or antioxidant supplements. All participants gave written informed consent, and the study protocol was fully approved by the Ethical Committee of the University of Londrina (Paraná, Brazil).

### *Anthropometric measurements*

Body weight was measured to the nearest 0.1 kg using electronic scales, with individuals wearing light clothing, but no shoes, in the morning; height was measured to the nearest 0.1 cm by using a stadiometer. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared.

### *Biochemical and Immunological Biomarkers*

After fasting for 12h, the patients underwent the following laboratory blood analysis: levels of uric acid (UA) were evaluated with a biochemical auto-analyzer (Dimension Dade AR Dade Behring, USA) using Dade Behring® kits. Serum complement factors C3 and C4 levels were measured using immunoturbidimetric assay (C8000 Architect Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). Antinuclear antibodies (ANA) were quantified using indirect immunofluorescence with HEp2 cells as substrate (IFI-ANA-HEp 2-IgG, Viro-Immun-Labor-Diagnostika, GmbH, Oberursel, Germany) and were considered significant when titers  $\geq 1:160$ . Antibodies against anti-dsDNA and anti-NCS were quantified using enzyme linked immunoassay (ELISA, anti-dsDNA, Orgentec Diagnostika, GmbH, Germany) and were considered significant when titers  $\geq 20$  IU/mL.

### *Oxidative stress measurements*

Samples for evaluating oxidative stress and total antioxidant capacity were performed with EDTA as anticoagulant and antioxidant. We used collector tubes with a standard anticoagulant dose of 0.5 mL EDTA for each 4.5 mL blood sample. The samples were centrifuged at 3000 rpm for 15 min and plasma aliquots were stored at  $-70^{\circ}$  C until assayed.

### *tert-Butyl-Hydroperoxide-Initiated Chemiluminescence (CL-LOOH)*

Analysis of CL-LOOH in plasma was evaluated as described previously by Flecha et al. (1991) (Flecha et al., 1991). CL-LOOH is a method used to measure lipid hydroperoxides originating from phospholipids, cholesterol esters, protein, and free fat acid oxidation and decreased antioxidants levels, brought about by previous free radical action mainly on plasma lipoprotein particles. This test is based on the assumption that an increase in chemiluminescence is related to the oxidative stress previously suffered by the tissue, inducing the consumption of antioxidant defenses such as vitamin E and the formation of lipoperoxides resulting in an increase in photon emission. Differences in the curve inclination reflect differences in the amount of antioxidants in a sample, whereas higher photon emission levels reflect higher amount in hydroperoxides previously produced in a sample (Simão et al., 2006). Thus, the results were expressed as a curve, which demonstrates the kinetic reaction at the same period (Simão et al., 2006; Simão et al., 2008).

### *Determination of advanced oxidation protein products (AOPP)*

AOPP were determined in plasma using the semi-automated method described by Witko-Sarsat et al. (1998) (Witko-sarsat et al., 1998). AOPP concentrations were expressed as  $\mu\text{mol}$  of chloramines-T equivalents.

### *DNA/RNA oxidation damage*

ELISA test (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) performed for the measurement of DNA/RNA oxidative damage detects all three oxidized guanine species; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine from DNA, 8-hydroxyguanosine from RNA, and 8-hydroxyguanine from either DNA or RNA. The concentration of DNA/RNA products of oxidation were expressed in  $\text{pg/mL}$ .

### *NOx levels*

Serum NOx levels were assessed based on nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) concentration according to the Griess reaction supplemented by the reduction of nitrate to nitrite with cadmium. (Guevara et al., 1998; Navarro-gonzalvez et al., 1998). The results of NOx levels are reported as  $\mu\text{M}$ .

### *Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP)*

The TRAP was determined as reported by Repetto et al. (1996) (Repetto et al., 1996). This method detects hydrosoluble and/or liposoluble plasma antioxidants by measuring the chemiluminescence inhibition time induced by 2,2-azobis (2-amidinopropane) (ABAP). Soluble E vitamin (Trolox) was used as the reference antioxidant and luminol solution was used as the reaction amplifier. Chemiluminescence curves were obtained in a Beckman LS 6000 liquid scintillation counter set to the out-of-coincidence mode with a response of 300-620nm. TRAP measurements in conditions associated with hyperuricemia, such as LN, may be inaccurate because uric acid (UA) concentration accounts for 60% of total plasma antioxidant capacity. Thus, a correction of TRAP based on uric acid concentration was performed and the results of TRAP corrected by uric acid value are expressed in equivalent of  $\mu\text{M}$  Trolox/AU  $\text{mg/dL}$  (Venturini et al., 2012).

### *Statistical analysis*

Categorical data were analyzed with Fisher's exact test or chi-square test when appropriate. Absolute number demonstrated the results. The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess normality of distribution. Natural logarithmic (Ln) transformation of continuous data (BMI, C3, dsDNA, NCS, AOPP, and NOx) was used in the analyses when the variables were not normally distributed. Comparisons between SLE group with or without nephritis, and active and remission disease were performed using t Student test. Data were expressed as the mean ( $\pm$ SEM). The results of these univariate statistical analyses were used to delineate the significant explanatory variables to be used as determinants of independent association with the diagnostic groups in subsequent logistic regression analyses. Bivariate logistic regression analysis was used to define the significant association of patients with nephritis versus without nephritis, and patients with active versus remission disease using the biomarkers with  $p < 0.1$ . Correlations were assessed using Pearson test. All tests were 2-tailed and a p-value of 0.05 was used for statistical significance. All analyses were conducted with SPSS 20.0 software (SPSS, Chicago, IL, USA).

## **RESULTS**

Clinical and biochemical parameters of patients with or without LN are shown in Table 1. There were no differences between the groups regarding gender, ethnicity, disease duration, SLEDAI  $\geq 6$ , C3 and C4 levels. However, patients with LN had significantly higher BMI ( $p < 0.0001$ ), mycophenolate use ( $p = 0.001$ ) and higher serum levels of anti-dsDNA ( $p = 0.033$ ) and anti-NCS ( $p = 0.002$ ) antibodies, whereas they showed lower age ( $p = 0.039$ ) than the patients without LN.

O&NS parameters are show in Table 2. Patients with LN showed higher levels of NOx ( $p = 0.030$ ) and lower levels of AOPP ( $p = 0.010$ ) than patients without nephritis. No difference was observed in TRAP and DNA/RNA oxi when the two groups were compared.

Figure 1 shows Pearson correlation between BMI and serum levels of anti-dsDNA antibodies (A) and between BMI and serum levels of anti-NCS antibodies (B). Body mass index was positively correlated with anti-dsDNA ( $r = 0.183$ ,  $p = 0.016$ ) and anti-NCS ( $r = 0.202$ ,  $p = 0.022$ ) antibodies.

Table 3 shows the logistic regression analysis with the presence of lupus nephritis as dependent variable (absence of lupus nephritis as the reference group) and the listed biomarkers as explanatory variables in different models with confounder factor inclusion. In

model 1, AOPP (OR: 0.986, CI 95%: 0.973-0.995,  $p=0.034$ ) was inversely associated whereas NOx (OR: 1.035, CI 95%: 1.001-1.069,  $p=0.043$ ) and anti-NCS antibodies (OR: 1.009, CI 95%: 1.001-1.017,  $p=0.035$ ) were directly associated with LN independently of age. In model 2, when BMI was included (OR:1.161, CI 95%: 1.030-1.309,  $p=0.015$ ), AOPP (OR:0.984, CI 95%: 0.970-0.998,  $p=0.025$ ) and anti-NCS antibodies (OR: 1.009, CI 95%: 1.001-1.018,  $p=0.036$ ) maintained their association with LN independently of age and BMI. In model 3, after inclusion of mycophenolate use (OR: 0.034, CI 95%: 0.04-0.272,  $p=0.001$ ), association between LN and anti-NCS antibodies were not found (OR: 1.004, CI 95%: 0.993-1.015,  $p=0.459$ ). However, AOPP (OR: 0.973, CI 95%: 0.953-0.992,  $p=0.007$ ) and BMI (OR: 1.186, CI 95%: 1.018-1.382,  $p=0.029$ ) remained independently associated with LN.

Clinical and laboratory characteristics in patients with LN in remission or activity are shown in Table 4. No differences were observed between these groups of LN with regard to gender, ethnicity, age, BMI, C4 and serum levels of anti-dsDNA and anti-NCS antibodies. Patients with active LN showed increased SLEDAI score ( $p<0.0001$ ) when compared with patients in LN remission and a decreased trend in C3 levels ( $p=0.077$ ) in active LN was also verified.

Table 5 demonstrates O&NS in active nephritis and nephritis in remission. No differences were found between DNA/RNA oxi and TRAP in both groups. However patients with active nephritis had higher AOPP ( $p=0.022$ ) and lower levels of NOx ( $p=<0.0001$ ) when compared to patients with nephritis in remission.

In relation to oxidative stress curve, patients with LN ( $p<0.0001$ ) and LN activity ( $p<0.0001$ ) showed greater inclination and increased photon emission demonstrating increased oxidative stress compared to subjects without LN and LN in remission, respectively (figure 2).

Table 6 demonstrates the outcome of a logistic regression analysis with active nephritis as dependent variable, patients with LN in remission as the reference group and the significant variables shown in Table 4 and Table 5 and listed biomarkers as explanatory variables. It was observed that increased AOPP levels (OR=1.027, CI 95%: 1.000-1.055,  $p=0.046$ ) and decreased NOx levels (OR=0.920, CI 95%: 0.847-0.999,  $p=0.049$ ) were independently associated with disease activity in patients with nephritis.

## DISCUSSION

The main finding of the present study was that LN is associated with lower AOPP levels and higher anti-NCS antibodies levels. In addition, LN was also associated with the increase in BMI. After controlling for the use of mycophenolate, the association between LN and anti-NCS antibodies has not remained, however LN association with AOPP and BMI persisted. Another important finding of this study was the direct association between active LN and AOPP levels as well as an inverse association between active LN and NO<sub>x</sub> levels.

In recent years, anti-dsDNA and anti-NCS antibodies have been proposed as specific and sensitive biomarkers for the development of LN, but the results remain controversial among different studies. Some authors demonstrated no differences in relation to the serum levels of anti-dsDNA between patients with and without nephritis as well as those with active nephritis and in remission (Gladman et al., 1979; Isenberg et al., 1984; Esdaile et al., 1996). However, many other studies reported that high levels of anti-dsDNA antibodies have been correlated with the severity of disease and the presence of LN (Manson et al., 2009; Zivkovic et al., 2014; Alba et al., 2003; Okamura et al., 1993). In the present study, anti-NCS antibodies levels were directly associated to LN even when these variables were controlled for BMI, but when mycophenolate use was added in this model, the association lacked its significance. Previous studies also concluded that anti-NCS antibodies have high prevalence in LN but they do not differentiate active from inactive LN (Bizzaro et al., 2012; Bigler et al., 2008). It is possible that discrepancies between studies could be explained by differences in study design, serological characteristics, and classification of disease activity. In addition to these factors, our data also demonstrate that plasma levels of these antibodies are directly related to BMI of the patients, and this may be a possible confounding uncontrolled factor in previous studies.

It has been demonstrated that increased O&NS is involved in nucleic acid alterations leading to the formation of autoantibodies (Ohmori and Kanayama, 2005). Although several studies have shown increased O&NS in SLE patients (Lozovoy et al., 2011; Shah et al., 2014), many issues remain unclear regarding its role in LN pathophysiology. In the current study, AOPP showed a different behavior depending on the presence or absence of nephritis in patients with lupus and whether LN was in activity or in remission. Lower AOPP levels seem to be important to determine the presence of renal disease. On the other hand, higher AOPP levels were found in patients with active LN.

AOPP is derived from oxidation-modified albumin, as well as fibrinogen and lipoproteins. AOPP is formed during oxidative stress by the activation of chloraminated oxidants, mainly hypochlorous acid and chloramines, produced by myeloperoxidase in activated neutrophils (Cakatay, 2005). An increase in AOPP levels indicates oxidative stress and the presence of coexisting inflammation. Therefore, elevation of plasma AOPP levels may result in accelerated progression of renal damage with consequent increased oxidative stress and inflammation and these later conditions may further increase AOPP formation originating a vicious circle. This positive feedback loop could amplify or maintain the imbalance of redox and inflammatory status and thereby promote the progression of renal dysfunction (Li et al., 2007). Unexpectedly, in the present study, AOPP decreased in patients with LN when compared with those patients who did not have this condition. Nevertheless, some hypotheses could explain the fact that AOPP was not elevated in patients with LN in the current study. First, selective degradation of AOPP is performed by the proteasome in which mildly oxidized proteins are readily degraded, whereas severe oxidation stabilizes proteins due to aggregation, cross-linking, and decreased solubility, thus increasing their half-lives (Grune et al., 2003). Second, superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) can modify proteins and enhance their degradation by intracellular proteolytic systems (Davies and Delsignore, 1987; Grune et al., 1997). However, patients showed higher levels of AOPP in active nephritis than those in remission. As activity in LN leads to an inflammatory process and oxidative stress, it is conceivable to suggest that the increase in AOPP levels could be due to the saturation in the capacity of degradation and excretion of these protein products. Altogether, our data allow suggesting that the increase in protein oxidation can be a precocious indication of renal activity in lupus patients.

Regarding nitrosative stress, in this study NOx levels were directly associated to LN independently of age. Nevertheless, when BMI and the use of mycophenolate were included in the regression model, the association lacked its significance, showing the important role of these confounder variables in the analysis. We also verified an inverse association with NOx in patients with active LN. However, differently from our study, Oates et al. (Oates et al., 2008) reported that NOx levels did not differ between patients with active nephritis and patients with previous history of the disease. In addition, those authors showed an association between serum NOx levels and response to the therapy for LN. The patients with active LN were divided into responders and non-responders. Among non-responders, NOx levels were significantly higher than those in responders. The authors suggested that therapy for active LN could reduce RNS production in order to prevent renal damage (Oates et al., 2008). The

decreased NO<sub>x</sub> levels shown in the present study in active LN, seem to confirm this hypothesis.

Another possibility is related to the increased oxidative stress verified in patients with active LN. It is feasible to suggest that in conditions of inflammation and increased oxidative stress, NO is consumed in a reaction with superoxide anion yielding the strong oxidant peroxynitrite, which in turn accelerates the lipid peroxidation reaction and decrease NO bioavailability (Li et al., 2007; Lin et al., 2007; Simão et al., 2011; Tao et al., 2007).

## **CONCLUSION**

In conclusion, lower AOPP levels and higher anti-NCS antibodies and BMI were associated with the presence of LN, whereas the increased levels of AOPP and the decreased levels of NO<sub>x</sub> were independently associated with the activity in LN. The anti-NCS antibodies showed to be good predictors of the presence of LN but not of activity in LN. The concomitant evaluation of O&NS and anti-NCS antibodies are useful tools in identifying and monitoring disease activity in LN.

## **Acknowledgments**

The study was supported by Institutional Program for Scientific Initiation Scholarship (PIBIC) of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Fundação Araucária.

## **Conflict of Interest Statement**

All the authors declare that there is no conflict of interest.

## REFERENCES

- Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, Cacoub P, Amoura I, Musset L, et al., 2000. Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*. 43(1), 76–84, doi:10.1002/1529-0131(200001)43:1.
- Alba P, Bento L, Cuadrado MJ, Karim Y, Tungekar MF, Abbs I, et al., 2003. Anti-dsDNA, anti-SM antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis. *Ann Rheum Dis*. 62, 556-560, doi: 10.1136/ard.62.6.556.
- Bigler C, Lopez-Trazcasa M, Potlukova E, Moll S, Danner D, Schaller M, et al., 2008. Anti-nucleosome antibodies as a marker of active proliferative lupus nephritis. *Am J Kidney Dis*. 51, 624-629, doi:10.1053/j.ajkd.2007.10.041.
- Bizzaro N, Villalta D, Giavarina D, Tozzoli R., 2012. Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker than anti-dsDNA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and a study of metanalysis. *Autoimmunity Reviews*. 12(2), 97-106, doi:10.1016/j.autrev.2012.07.002.
- Cakatay U., 2005. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes Metab* 31, 551–7, doi:10.1016/S1262-3636 (07)70230-6.
- Cervera R, Vinas O, Ramos-Casals M, Font J, García-Carrasco M, Sisó A, et al., 2003. “Anti-chromatin antibodies in systemic lupus erythematosus: a useful marker for lupus nephropathy,” *Annals of the Rheumatic Diseases*. 62(5), 431–434, doi: 10.1136/ard. 62.5.431 .
- Cortés-hernández J, Ordi-Ros J, Labrador M, Buján S, Balada Eva, Segarra Alfons, et al., 2004. Anti-histone and anti-double-stranded deoxyribonucleic acid antibodies are associated with renal disease in systemic lupus erythematosus. *Am J Med*. 116,165-173, doi:10.1016/j.amjmed.2003.08.034.
- Davies KJA, Delsignore ME., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. Modification of secondary and tertiary structure. *J Biol Chem*. 262(20), 9908-9913.
- Esdaile JM, Abrahamowicz M, Joseph L, Mackenzie T, Li Y, Danoff D., 1996. Laboratory tests as predictors of disease exacerbations in systemic lupus erythematosus. Why some tests fail. *Arthritis and Rheumatism*. 39(3), 370-378.
- Fan A, Jiang X, Mo Y, Tan H, Jiang M, Li J., 2015. Plasma levels of oxidative stress in children with steroid-sensitive nephrotic syndrome and their predictive value for relapse frequency. *Pediatr Nephrol*. 6 pages, doi: 10.1007/s00467-015-3195-2 .

- Flecha BG, Llesuy S, Boveris A., 1991. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Rad Biol Med.* 10, 93–100.
- Gladman DD, Urowitz MB, Keystone EC., 1979. Serologically active clinically quiescent systemic lupus erythematosus: discordance between clinical and serological features. *Am J Med.* 66, 210-215.
- Gómez-puerta JA, Burlingame RW, Cervera R., 2008. Antichromatin (anti-nucleosome) antibodies: diagnostic and clinical value. *Autoimmunity Reviews.* 7( 8), 606–611, doi:10.1016/j.autrev.2008.06.005.
- Grune T, Merker K, Sanding G, Davies KJ., 2003. Selective degradation of oxidatively modified protein substrate by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun.* 305, 709-718, doi:10.1016/S0006-291X(03)00809-X.
- Grune, T, Reinheckel T, Davies KJA., 1997. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *Faseb J.* 11, 526-534, doi: 0892-6638/97/0011 -0526.
- Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kie C, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, et al., 1998. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta.* 274, 177-188, doi:10.1016/S0009-8981(98)00060-6 .
- Gutiérrez-Adrianzén AO, Joutousov S, Mota RMS, Medeiros MMC, Bach JF, Campos HH., 2006. Diagnostic value of anti-nucleosome antibodies in the assessment of disease activity of systemic lupus erythematosus: a prospective study comparing anti-nucleosome with anti-dsDNA antibodies. *J Rheumatol.* 33(8), 1538-1544.
- Hochberg, M. C., 1997. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 40 (9), 1725, doi: 10.1002/art.1780400928.
- Isenberg DA, Shoenfeld Y, Schwartz RS., 1984. Multiple serologic reactions and their relationship to clinical activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 27, 132-138, doi: 10.1002/art.1780270203.
- Li HY, Hou FF, Zhang X, Chen PY, Liu SX, Feng JX et al., 2007. Advanced oxidation protein products accelerate renal fibrosis in a remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol.* 18, 528-538, doi: 10.1681/ASN.2006070781.
- Li R, Wang WQ, Zhang H, Yang X, Fan Q, Christopher TA, Lopez BL, Tao L, Goldstein BJ, Gao F, Ma XL., 2007. Adiponectin improves endothelial function in hyperlipidemic rats by reducing oxidative/nitrative stress and differential regulation of eNOS/iNOS activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293(6), 1703-8, doi:10.1152/ajpendo.00462.2007.
- Lin, LY, Lee WJ, Shen HN, Yang WS, Pai NH, Su TC, et al., 2007. Nitric oxide production is paradoxically decreased after weight reduction surgery in morbid obesity patients. *Atherosclerosis.* 190, 436-442, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.02.033.

- Liu CC, Kao AH, Manzi S, Ahearn JM., 2013. Biomarkers in systemic lupus erythematosus: challenges and prospects for the future. *Ther Adv Musculoskel Dis.* 5(4), 210-233, doi: 10.1177/1759720X13485503 .
- Lozovoy M, Simão A, Panis C, Rotter M, Reiche E, Morimoto H, et al., 2011. Oxidative stress is associated with liver damage, inflammatory status, and corticosteroid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 20, 1250–9, doi: 10.1177/0961203311411350 .
- Lozovoy MAB, Simão NC, Oliveira SR, Iryioda TM V, Panis C, Cecchini R, et al., 2013. Relationship between iron metabolism, oxidative stress, and insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol.* 42, 303–10, doi: 10.3109/03009742.2012.754942.
- Manson JJ, Ma A, Rogers P, Mason JL, Berden JH, Van de Vlag J, et al., 2009. Relationship between anti-dsDNA, anti-nucleosome and anti-alpha-actinin antibodies and markers of renal disease in patients with lupus nephritis: a prospective longitudinal study. *Arthritis Research and Therapy.* 11,1-9, DOI: 10.1186/ar2831.
- Mok CC., 2010. Biomarkers for lupus nephritis: a critical appraisal. *J Biomed Biotechnol.* 2010, 1-11, doi:10.1155/2010/638413.
- Morgan PE, Sturgess AD, Davies MJ., 2005. Increased levels of serum protein oxidation and correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthr Rheum.* 52, 2069–2079, doi: 10.1002/art.21130.
- Moroni G, Quaglini S, Radice A, Trezzi B, Raffiotta F, Messa P, et al., 2015. The value of a panel of autoantibodies for predicting the activity of lupus nephritis at time of renal biopsy. *J Immunol Res.* ID 106904, 8 pages, doi: 10.1155/2015/106904.
- Mostoslavsky G, Fischel R, Yachimovichi N, Yarkoni Y, Rosenmann E, Monestier M, et al., 2001. Lupus anti-DNA autoantibodies cross-react with a glomerular structural protein: a case for tissue injury by molecular mimicry. *Eur J Immunol.* 31, 1221-1227, doi:10.1002/1521-4141(200104)31:4 .
- Navarro-gonzalvez JA, Garcia-benayas C, Arenas J., 1998. Semi-automated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem.* 44, 679-681.
- Oates JC., 2010. The biology of reactive intermediates in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 43, 56-63, doi: 10.3109/08916930903374683.
- Oates JC, Shaftman SR, Self SE, Gilkeson GS., 2008. Association of serum nitrate and nitrite levels with longitudinal assessments of disease activity and damage in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 58,263-272, doi: 10.1002/ art.23153 .
- Ohmori H, Kanayama N., 2015. Immunogenicity of an inflammation-associated product, tyrosine nitrated self-proteins. *Autoimmun Rev.* 4(4), 224-9, doi:10.1016/j.autrev.2004.11.011.

- Okamura MY, Kanayama Y, Amastu K, Negoro N, Kohda S, Takeda T, et al., 1993. Significance of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to double stranded DNA and single stranded DNA with patients with lupus nephritis : correlation with severity of renal histology. *Ann Rheuma Dis.* 52, 14-20, doi: 10.1136/ard.52.1.14.
- Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, Costa M, Griemberg G, Llesuy S., 1996. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta.* 255, 107–17, doi:10.1016/0009-8981(96)06394-2.
- Shah D, Mahajan N, Shah S, Nath SK, Paudyal B., 2014. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *Journal of Biomedical Science.* 21, 23, doi:10.1186/1423-0127-21-23.
- Simão ANC, Suzukawa AA, Casado MF, Oliveira RD, Guarnier FA, Cecchini R et al., 2006. Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,2'-Azobis (Amidinopropane). *Life Sci.* 78, 1202–10, doi:10.1016/j.lfs.2005.06.047.
- Simão ANC, Lozovoy MAB, Simão TNC, Venturini D, Barbosa DS, Dichi JB, Matsuo T, Cecchini R, Dichi I., 2011. Immunological and biochemical parameters of patients with metabolic syndrome and the participation of oxidative and nitroactive stress. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 44, 707-712, doi: 10.1590/S0100-879X2011007500069.
- Simão ANC, Dichi JB, Barbosa DS, Cecchini R, Dichi I., 2008. Influence of uric acid and gamma glutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. *Nutrition.* 24, 675–81, doi:10.1016/j.nut.2008. 03.021.
- Simón JA, Gabiedes J, Oetiz E, Alcocer-Varela J, Sánchez-Guerrero., 2004. “Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus of recent onset. Potential utility as diagnostic tool and disease activity marker”. *Rheumatology.* 43(2), 220–224, doi:10.1093/rheumatology/keh024.
- Sui M, Lin Q, Xu Z, Han X, Xie R, Jian X, et al., 2013. Simultaneous positivity for anti-dsDNA, anti-nucleosome and anti-histone antibodies is a marker for more severe lupus nephritis. *J Clin Immunol.* 33, 378-387, doi: 10.1007/s10875-012-9825-6.
- Tao L, Gao E, Jiao X, Yuan Y, Li S, Christopher TA, Lopez BL, Koch W, Chan L, Goldstein BJ, Ma XL., 2007. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrate stress. *Circulation.* 115(11), 1408-16, doi: 10.1161/circulationaha.106.666941.
- Uramoto KM, Michet CJ JR, Thumboo J, Sunku J, O’Fallon WM, Gabriel SE., 1999. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 42, 46-50, doi: 10.1002/1529-0131(199901)42:1.
- van Bavel CC, Fenton KA, Rekvig OP, Van der Vlag J, Berden JH, et al., 2008. Glomerular targets of nephritogenic autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 58, 1892-1899, doi: 10.1002/art.23626.

- Venturini D, Simão AN, Sripes NA, Bahls LD, Melo PA, Bellinetii FM, et al., 2012. Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without syndrome metabolic. *Obesity (silver spring)*. 20(12), 2361-6, doi: 10.1038/oby.2012.130.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al., 1996. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 49,1304–13, doi:10.1038/ki.1996.186.
- Witko-sarsat V, Friedandler M, Nguyen Khoa T, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, et al., 1998. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J. Immunol*. 16, 2524-2532, doi: 0022-1767/98.
- Yung S, Chan T M., 2012. Autoantibodies and resident renal cells in the pathogenesis of lupus nephritis: getting to know the unknown. *Clin Develop Immuno*. 1-13, doi:10.1155/2012/139365.
- Yung S, Cheung KF, Zhang Q, Chan TML., 2013. Mediators of inflammation and their effect on resident renal cells: implications in lupus nephritis. *Clin Develop Immunol*. 2013, 1-10, doi:10.1155/2013/317682.
- Zivkovic V, Stankovic A, Cvetkovic T, Mitic B, Kistic S, Nedovic J, et al., 2014. Anti-dsDNA, anti-nucleosome and anti-C1q antibodies as disease activity markers in patients with systemic lupus erythematosus. *Srp Arh Celok Lek*. 142(7-8), 431-436, doi: 10.2298/sarh1408431z .

Table 1: Clinical and laboratory data of patients with systemic lupus erythematosus in the presence or absence of lupus nephritis.

<b>Parameters</b>	<b>Without Nephritis</b>	<b>With Nephritis</b>	<b>p</b>
	<b>N = 152</b>	<b>N = 48</b>	
Gender (F/M)	141/11	45/3	0.815
Ethnicity (C/NC)	103/49	29/19	0.349
Age (years)	42.6 (1.1)	38.1 (1.7)	<b>0.039</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.03 (0.43)	30.12 (0.75)	<b>&lt;0.0001</b>
Duration of disease (years)	9.8 (0.6)	9.8 (1.0)	0.981
Prednisone mg/Day	12.02 (0.9)	11.6 (1.4)	0.825
Prednisone (Y/N)	147/5	46/2	0.871
Hydroxychloroquine (Y/N)	112/40	30/18	0.192
Mycophenolate (Y/N)	22/130	18/30	<b>0.001</b>
Immunosuppressive (Y/N)	59/93	25/23	0.145
SLEDAI $\geq$ 6 (Y/N)	35/117	12/36	0.932
C3 (mg/dL)	114.1 (2.2)	109.5 (3.4)	0.292
C4 (mg/dL)	21.48 (0.78)	20.38 (1.86)	0.688
Anti-dsDNA (U/mL)	43.06 (4.91)	57.45 (11.00)	<b>0.033</b>
Anti-NCS (U/mL)	63.51 (6.65)	123.34 (22.95)	<b>0.002</b>

---

Categorical data were analyzed by chi-square test and expressed in absolute numbers (n). Continuous data were analyzed using the t-Student test and expressed as mean ( $\pm$ SEM). F, female; M, male; C, Caucasian; NC, not Caucasian; BMI, body mass index; SLEDAI, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; anti-dsDNA, *anti-double-stranded* DNA; anti-NCS, anti-nucleosome antibodies.

Table 2: Oxidative stress and nitrosative biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus in the presence or absence of lupus nephritis

Parameters	Without Nephritis N = 152	With Nephritis N = 48	p
AOPP (umol/L of chloramines-T equivalents)	185.6 (7.0)	149.2 (9.7)	<b>0.010</b>
DNA/RNA oxi (pg/mL)	6768 (460)	6360 (371)	0.632
NOx (uM)	27.83 (1.61)	34.42 (3.20)	<b>0.030</b>
TRAP/UA (μM Trolox/UA mg/dL)	144.6 (4.2)	137.4 (8.5)	0.422

Categorical data were analyzed by chi-square test and expressed in absolute numbers (n). Continuous data were analyzed using the t-Student test and expressed as mean ( $\pm$ SEM). AOPP, advanced oxidation protein products; NOx, nitric oxide metabolites; TRAP, *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*; AU, uric acid.

Table 3: Logistic regression analysis with the presence of lupus nephritis as dependent variable (absence of lupus nephritis as the reference group) and the listed biomarkers as explanatory variables in different models.

	Model 1		Model 2		Model 3	
	OR (CI 95%)	P	OR (CI 95%)	p	OR (CI 95%)	p
AOPP	0.986 (0.973-0.995)	<b>0.034</b>	0.984 (0.970-0.998)	<b>0.025</b>	0.973 (0.953-0.992)	<b>0.007</b>
NOx	1.035 (1.001-1.069)	<b>0.043</b>	1.033 (0.996-1.072)	0.08	1.035 (0.988-1.083)	0.145
Anti-dsDNA	0.991 (0.975-1.008)	0.301	0.985 (0.967-1.002)	0.085	0.980 (0.959-1.002)	0.076
Anti-NCS	1.009 (1.001-1.017)	<b>0.035</b>	1.009 (1.001-1.018)	<b>0.036</b>	1.004 (0.993-1.015)	0.459
Age	0.983 (0.937-1.032)	0.495	0.959 (0.905-1.016)	0.151	0.988 (0.924-1.057)	0.731
BMI	--	--	1.161 (1.030-1.309)	<b>0.015</b>	1.186 (1.018-1.382)	<b>0.029</b>
Mycophenolate	--	--	--	--	0.034 (0.04-0.272)	<b>0.001</b>

AOPP, advanced oxidation protein products; NOx, nitric oxide metabolites; anti-dsDNA, *anti-double-stranded* DNA antibodies; Anti-NCS, anti-nucleosome antibodies; BMI, body mass index.

Model 1, adjusted for age (years).

Model 2, additionally adjusted for BMI (kg/m<sup>2</sup>).

Model 3, additionally adjusted for mycophenolate (Y/N).

Table 4: Clinical and laboratory data of patients with lupus nephritis in remission and in activity.

Parameters	Nephritis in Remission N = 36	Active Nephritis N = 12	P
Gender (F/M)	33/3	11/1	1.000
Ethnicity (C/NC)	23/13	6/6	0.609
Age (years)	37.7 (1.97)	39.3 (3.3)	0.694
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	30.1 (0.9)	30.3 (1.5)	0.924
Prednisone (mg/day)	10.7 (1.4)	14.6 (4.2)	0.263
Prednisone (Y/N)	35/01	10/02	0.1501
Hydroxychloroquine (Y/N)	23/13	07/05	1.000
Mycophenolate (Y/N)	13/23	06/08	0.9070
Immunosuppressive (Y/N)	18/18	07/05	0.8675
SLEDAI	2.31 (0.26)	8.83 (1.22)	<b>&lt;0.0001</b>
C3(mg/dL)	113.01 (3.61)	98.99 (7.99)	0.077
Anti-dsDNA (U/mL)	55.87 (13.29)	52.04 (16.54)	0.877
Anti-NCS (U/mL)	120.65 (26.47)	115.54 (37.29)	0.931

Categorical data were analyzed by chi-square test and expressed in absolute numbers (n). Continuous data were analyzed using the t-Student test and expressed as mean ( $\pm$ SEM). F, female; M, male; C, Caucasian; NC, not Caucasian; BMI, body mass index; SLEDAI, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index; anti-dsDNA, *anti-double-stranded* DNA antibodies; Anti-NCS, anti-nucleosome antibodies.

Table 5: Oxidative stress and nitrosative biomarkers in patients with lupus nephritis in remission and in activity.

Parameters	Nephritis in remission N = 36	Active Nephritis N = 12	p
AOPP (umol/L of chloramines-T equivalents)	119.86 (4.96)	170.40 (18.67)	<b>0.022</b>
DNA/RNA oxi (pg/mL)	6550 (436)	5787 (709)	0.380
NOx (uM)	41.84 (4.08)	22.33 (1.64)	<b>&lt;0.0001</b>
TRAP ( $\mu$ M Trolox /UAmg/dL)	135.14 (11.11)	144.12 (7.66)	0.649

Categorical data were analyzed by chi-square test and expressed in absolute numbers (n). Continuous data were analyzed using the t-Student test and expressed as mean ( $\pm$ SEM). AOPP, advanced oxidation protein products; DNA/RNA oxi, DNA/RNA oxidative damage; NOx, nitric oxide metabolites, TRAP, *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*; AU, uric acid.

Table 6: Logistic regression analysis with active nephritis as dependent variable (lupus nephritis in remission as the reference group) and the listed biomarkers as explanatory variables.

	Wald	Df	P	OR	IC 95%
AOPP	3.983	1	<b>0.046</b>	1.027	1.000-1.055
NOx	3.797	1	<b>0.049</b>	0.920	0.847-0.999

AOPP: advanced oxidation protein products; NOx: nitric oxide metabolites

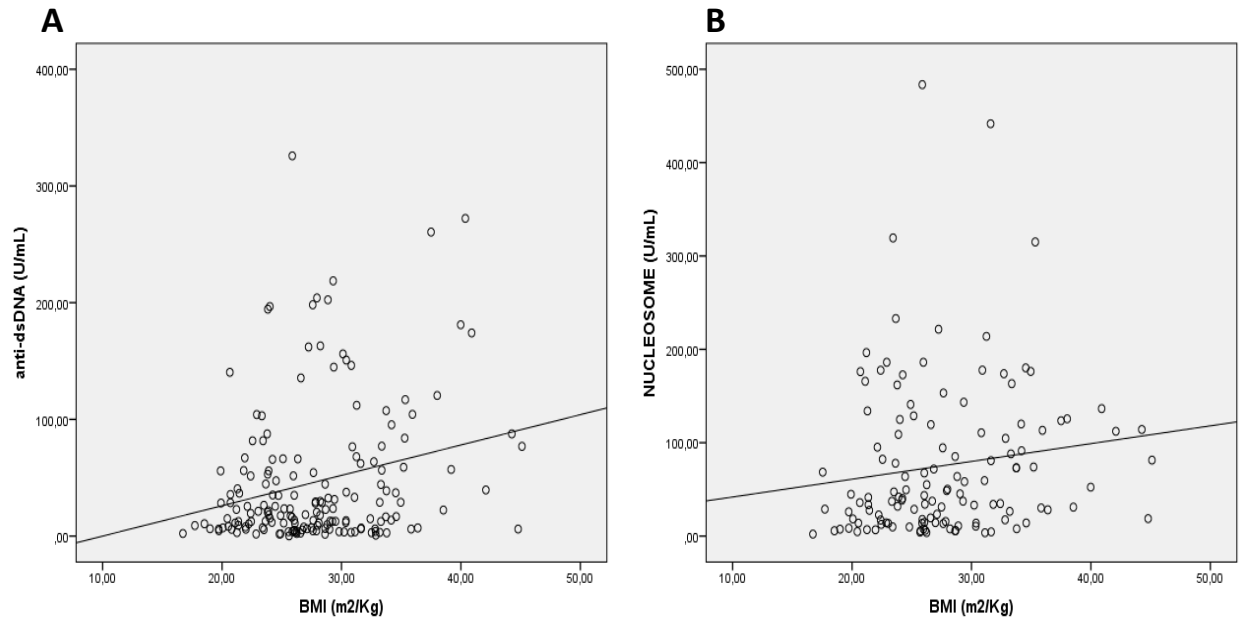


Figure 1: Pearson correlation between body mass index (BMI) and serum levels of anti-dsDNA antibodies (A) ( $r=0.183$ ,  $p=0.016$ ) and BMI and serum levels of anti-nucleosome (B) ( $r=0.202$ ,  $p=0.022$ ).

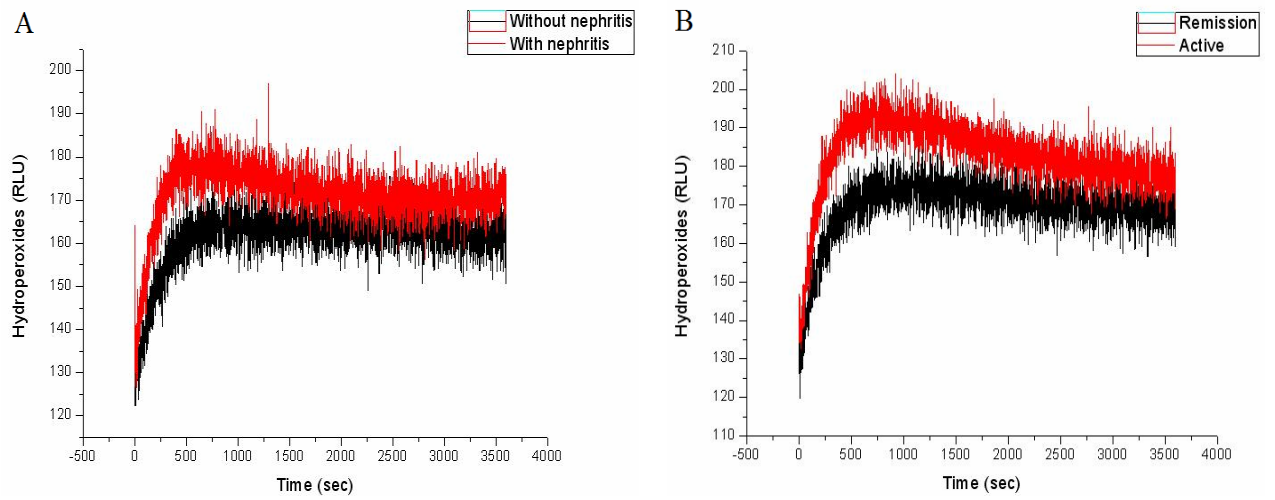


Figure 2: Oxidative stress profile evaluated by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence. A) Patients with lupus nephritis vs patients without lupus nephritis,  $p < 0.0001$  B) Patients with active lupus nephritis vs patients in remission,  $p < 0.0001$  RLU, relative unities light.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho nos permitem concluir que:

- Pacientes com NL apresentaram maiores níveis de anticorpos anti-NCS e anti-dsDNA quando comparados com pacientes sem NL. No entanto, estes anticorpos não diferiram com a presença de doença renal em atividade.
- Pacientes com NL apresentam um maior desequilíbrio redox quando comparados àqueles sem NL.
- A presença de NL está inversamente associada à AOPP e diretamente associada aos níveis de NOx e anticorpos anti-NCS, independentemente da idade. No entanto, os níveis de NOx perderam a significância estatística quando adicionado o IMC ao modelo de regressão logística, demonstrando a forte interferência do peso corpóreo neste marcador.
- Anticorpos anti-NCS perderam a significância estatística quando o uso de micofenolato foi acrescentado ao modelo de regressão logística.
- A atividade da NL altera a associação entre os marcadores de EO&N. A presença de NL ativa está diretamente associada aos níveis de AOPP e inversamente associada aos níveis de NOx.
- Os anticorpos anti-NCS mostraram-se bons preditores de presença de NL, mas não de atividade da doença.
- A avaliação concomitante dos marcadores de EO&N e os anticorpos anti-NCS, são ferramentas úteis na identificação e monitoramento da atividade da NL.

## REFERÊNCIAS

- AHSAN, H.; ALI, A.; ALI, R. Oxygen free radicals and systemic autoimmunity. **Clin Exp Immunol**, v.131, n.3, p.98–404, 2003.
- ARUOMA, O.I, Free radicals and oxidant strategies in sports. **J Nutr Biochem**, v.5, p.370-381, 1994.
- AVALOS, I. et al. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: relationship to disease activity and symptoms. **Lupus**, v.16, p.195–200, 2007.
- BELMONT, H. M. et al. Increased nitric oxide production accompanied by the up regulation of inducible nitric oxide synthase in vascular endothelium from patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v.40, p.1810-1816, 1997.
- BEN MANSOUR, R. et al. Enhanced reactivity to malondialdehyde-modified proteins by systemic lupus erythematosus autoantibodies. **Scand J Rheumatol**, v.39, p.247-253, 2010.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr**, v.12, n.12, p.123-30, 1999.
- BORBA, F. B. et al. Consenso Brasileiro de Doenças Reumáticas: Consenso de Lúpus Eritematoso Sistêmico. **Temas de Reumatologia Clínica**, v.10, n.1, p.15-26, 2009.
- BRITO, T.N.S. et al. Measuring eosinophiluria, urinary eosinophil cationic protein and urinary interleukin-5 in patients with Lupus Nephritis. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v.10, n.61, p.1-7, 2014.
- BRUNS, A. et al. Nucleosome are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v. 43, p. 2307-2315, 2000.
- CAMERON, J. S. Lupus nephritis. **J Am Soc Nephrol**, v.10, n.2, p.413–424,1999.
- CHAN, T.M. et al. Mesangial cell binding anti-DNA antibodies in patients with systemic lupus erythematosus, **J Am Soc Nephrol**, v. 13, n.5, p.1219–1229, 2002.
- D'CRUZ, D. P.; KHAMASHTA, M. A.; HUGHES, G. R. Systemic lupus erythematosus. **Lancet**, v.369, n.9561, p.587-596, 2007.
- DEAN, R. T. et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **J Biochem**, v.324, n.1, 1997.
- DELLAVANCE, A. et al. II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células HEp-2. Definições para padronização de pesquisa contra constituintes do núcleo, nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico e suas associações clínicas. **Rev Bras Reumatol**, v.43, p.129-140, 2003.
- DEOCHARAN, B.; QING, X.; LICHAUCO, J.; PUTTERMAN, C. Alpha-actinin is a cross-reactive renal target for pathogenic anti-DNA antibodies. **J Immunol**, v.168, p. 3072 – 8, 2002.

DESHMUKH, U.S; BAGAVANT, H.; FU, S.M. Role of anti-DNA antibodies in the pathogenesis of lupus nephritis. **Autoimmun Rev**, v.5, p.414–8, 2006.

DICHI, Isaias; Bregamó, José Wander; Simão, Andréa Name Colado; Cecchini, Rubens. Role of Oxidative Stress in Chronic Diseases. United States of America: CRC Press, 2014. 708p.

ESPEY, M.G. et al. Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative nitrosylation as a consequence of reaction with superoxide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.99, n.17, p.11127–11132, 2002.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v.43, n.1, p.61-8, 1997.

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

FROSTEGARD, J. et al. Lipid peroxidation is enhanced in patients with systemic lupus erythematosus and is associated with arterial and renal disease manifestation. **Arthr Rheum**, v.52, p.192-200, 2005.

GERGELY, P.J. et al., Mitochondrial hyperpolarization and ATP depletion in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v.46, p.175–190, 2002.

GEY, K.F. Vitamins E plus C and interacting co-nutrients required for optimal health. **Biofactors**, v.7, n.1/ 2, p.113-174, 1998.

GONZALES-CRESPO, M. R. et al. Prospective study of serum and urinary nitrate levels in patients with lupus erythematosus systemic. **Br J Rheumatol**, v.37, p.972-977, 1998.

GORDON C. Long-term complications of systemic lupus erythematosus. **Rheum (Oxf)**, v.41, p.1095–100, 2002.

GROOTSCHOLTEN, C. et al. Deposition of nucleosomal antigens (histones and DNA) in the epidermal basement membrane in human lupus nephritis. **Arthritis Rheum**, v.48, p.1355– 62, 2003.

GUNNETT, C. A.; HEISTAD, D. D.; FARACI, F. M. Gene target mice reveal a critical role for inducible nitric oxide synthase in vascular dysfunction during diabetes. **Stroke**, v.34, p.2970-2974, 2003.

HALLIWEL, B. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease. **Am J Med**, v.91 (suppl 3C), 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. New York: **Oxford University Press**, 1999. 936p.

HALLIWELL B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v.142, n.2, p.231-55, 2004.

- HANH, B. H. Antibodies to DNA. **N Engl J Med**, v.338, p.1359, 1998
- HART, H.H.; GRIGOR, R.R.; CAUGHEY, D.E. Ethnic difference in the prevalence of systemic lupus erythematosus. **Ann Rheum Dis**, v. 42, p.529-32, 1983.
- ISENBERG, D.A. et al. Detection of cross-reactive anti-DNA antibody idiotypes in the serum of systemic lupus erythematosus patients and of their relatives. **Arthritis Rheum**, v. 28, p. 999-1007, 1985.
- JENKINS, R.R. Free radical chemistry relationship to exercise. **Sports Med**, v.5, p.156-70, 1988.
- 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.
- KOTZIN, A. L.; O'DELL, J. R. Systemic lúpus erythematosus. In Frank MM, et al (eds): Samter's Immunologic Disease, 5.ed. **Boston Little: Brown**, 1995. 667 p.
- KOURY, J.C; Donangelo, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr**, v.16, n.4, p.433-41, 2003.
- KUONO, T. et al. Effect of methylprednisolone on plasma lipid peroxidation induced by lipopolysaccharide. **Jpn J Pharmacol**, v.64, p.163-169, 1994.
- KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Free radical mediated peroxidative damage in systemic lupus erythematosus. **Life Sci**, v.73, p.1655-1666, 2003.
- KYTTARIS, V.C; TSOKOS, G.C. T lymphocytes in systemic lupus erythematosus: an update. **Curr Opin Rheumatol**, v.16, p.548–552, 2004.
- 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.
- LI, Y.; FANG, X.; Li Q. Biomarker Profiling for Lupus Nephritis. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v.11, p.158–165, 2013.
- LI, H.Y. et al. Advanced oxidation protein products accelerate renal fibrosis in a remnant kidney model. **J. Am. Soc. Nephrol**, v.18, p.528-538, 2007.
- LINDAHL, B. et al. The FRISC Study Group markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. **N Engl J Med**, v.343, p.1139-1147, 2000.
- LOZOVOY, M.A.B. et al. Oxidative stress is associated with liver damage, inflammatory status, and corticosteroid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v.20, p.1250–1259, 2011.
- LOZOVOY, M.A.B et al. Oxidative stress is associated with liver damage, inflammatory status, and corticosteroid therapy in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 20, p.1250–9, 2011.

- MANSON, J.J. et al. Relationship between anti-dsDNA, anti-nucleosome and anti-alpha-actinin antibodies and markers of renal disease in patients with lupus nephritis: a prospective longitudinal study. **Arthritis Research and Therapy**, v.11, p.1-9, 2009.
- MISRA, R. ; GUPTA, R. Biomarkers in lupus nephritis. **Int J Rheum Dis**, v. 18, p. 219-232, 2015.
- MOK, C.C. Biomarkers for lupus nephritis: a critical appraisal. **J Biomed Biotechnol**, v.2010, p. 1-11, 2010.
- MOK, C.C. Understanding lupus nephritis: diagnosis, management, and treatment options. **Int J Womens Health**, v.4, p. 213-222, 2012.
- MOK, C.C. Towards new avenues in the management of lupus glomerulonephritis. **Nat Rev Rheumato**, 2016, doi:10.1038/nrrheum.2015.174.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109–142, 1991.
- MORGAN, P.E.; STURGESS, A.D.; DAVIES, M.J. Increased levels of serum protein oxidation and correlation with disease activity in systemic lupus erythematosus. **Arthr Rheum**, v. 52, p. 2069–2079, 2005.
- MORONI, G. et al. Oxidative stress and homocysteine metabolism in patients with lupus nephritis. **Lupus**, v. 19, p. 65–72, 2010.
- MOSTOSLAVSKY, G. et al. Lupus anti-DNA autoantibodies cross-react with a glomerular structural protein: a case for tissue injury by molecular mimicry. **Eur J Immunol**, n. 31, p. 1221-1227, 2001.
- NAGY, G. et al. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Arthritis Res Ther**, v.12, n.3, p.210, 2010.
- NAKASHIMA, C.A.K. et al. Incidência e aspectos clínico-laboratoriais do lúpus eritematoso sistêmico em cidade do Sul do Brasil. **Rev Bras Reumatol**, v.51, n.3, p.231-9, 2011.
- NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? **J Clin Invest**, v.100, p.2417-2423, 1997.
- NIGHTINGALE, A.L.; Farmer R.D.T, de Vries C.S. Incidence of clinically diagnosed systemic lupus erythematosus 1992-1998 using the UK General Practice Research Database. **Pharmacoepidemiol Drug Saf**, v.15, p.656-61, 2006.
- OATES, J.C. The biology of reactive intermediates in systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v.43, p.56–63, 2010.
- OATES, J.C. et al. Association of serum nitrate and nitrite levels with longitudinal assessments of disease activity and damage in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. **Arthritis Rheum**, v.58, n.1, p.263–272, 2008.

- OATES, J.C; GILKESON, G.S. The biology of nitric oxide and other reactive intermediates in systemic lupus erythematosus. **Clin Immunol**, v.121, p.243–50, 2006.
- ONISHI, S. et al. Novel Autoantigens Associated with Lupus Nephritis. **PLoS ONE**, v.10, n.6, p. 2015.
- PARKER, B.; BRUCE, I. N. The metabolic syndrome in systemic lupus erythematosus. **Rheum Dis Clin N Am.**, v.36, p.81-97, 2010.
- PEREIRA, B. et al. Superoxide dismutase, Catalase and Glutathione Peroxidase Activities in Immune organs and muscles of Sedentary and Exercised-Trained rats. **Physiol & Behav**, v.56, p.1095-1099, 1994.
- PERL, A. et al. T-cell and B-cell signaling biomarkers and treatment targets in lupus, **Curr. Opin. Rheumatol**, v.21, n.5, p. 454–464, 2009.
- PETRI, M. Hopkins Lupus Cohort - 1999 Update. **Rheum Dis Clin North Am**, v.26, p. 199-213, 2000.
- PISETSKY, D.S. DNA as a marker of cell death in systemic lupus erythematosus. **Rheum Dis Clin North Am**, v.30, p.575– 87, 2004.
- RAHMAN, A.; ISENBERG D.A. Systemic lupus erythematosus. **N Engl J Med**, vol. 358, n. 9, p. 929–939, 2008.
- REILLY, C.M. et al. Modulation of renal disease in MRL/lpr mice by pharmacologic inhibition of inducible nitric oxide synthase. **Kidney Int**, v.61, p.839–46, 2002.
- RUS, V.; HOCHBERG, M. C. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ, Hahn BH. Dubois' lupus erythematosus. 6 ed. **Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins**, 65-83 p, 2002.
- SATO, E.I. et al. Consenso brasileiro para o tratamento do lúpus eritematoso sistêmico (LES). **Rev. Bras. Reumatol** , v.42, n.6, nov/dez, 2002.
- SAXENA, R. et al. Lupus nephritis: curent update. **Arthritis Research & Therapy**, v.13, p.240, 1-12, 2011.
- SHAH, D. et al. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus: Relationship to Th1 cytokine and disease activity. **Immunology Letter**, v.129, p.7–12, 2010.
- SHAH, D. et al. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. **Journal of Biomedical Science**, v.21, n.23, 2014.
- SHAH, D. et al. Soluble granzyme B and cytotoxic T lymphocyte activity in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Cellular Immunology**, v. 269, p.16-21, 2011.
- SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev Nutr**, v.17, n.2, p.227-36, 2004.
- SIMÃO, A.N.C. et al. Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2,2'-Azobis (Amidinopropane). **Life Sci** 2006; 78:1202–10.

SIMÃO, A.N.C. et al. Influence of uric acid and gamma glutamyltransferase on total antioxidant capacity and oxidative stress in patients with metabolic syndrome. **Nutrition**, n.24, p.675–81, 2008.

SIMÓN, J. A. et al. “Anti-nucleosome antibodies in patients with systemic lupus erythematosus of recent onset. Potential utility as diagnostic tool and disease activity marker,” **Rheumatology**, v. 43, n. 2, p. 220–224, 2004.

SJODIN, B.; WESTING, Y. H.; APLE, F. S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. **Sports Med**, v.10, p. 236-254, 1990.

SKARE, T.; DAMIN, R.; HOFIUS, R. Prevalence of the American College of Rheumatology hematological classification criteria and associations with serological and clinical variables in 460 systemic lupus erythematosus patients. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v.37, n.2, p.115–119, 2015.

SUI, M. et al. Simultaneous positivity for anti-DNA, anti-nucleosome and anti-histone antibodies is a marker for more severe lupus nephritis. **J Clin Immunol**, v. 33, p. 378-387, 2013.

TAYSI, S. et al. Serum oxidant/antioxidant status of patients with systemic lupus erythematosus. **Clin Chem Lab Med**, v.40, p.684–8, 2002.

TELLES, R. W. 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.

ter BORG, E.J. et al. Measurement of increases in anti-double-stranded DNA antibody levels as a predictor of disease exacerbation in systemic lupus erythematosus. A long-term, prospective study. **Arthritis Rheum**, v.33, p. 634–43, 1990.

TEWTHANOM, K. et al. Correlation of Lipid Peroxidation and Glutathione Levels with Severity of Systemic Lupus Erythematosus: A Pilot Study from Single Center. **J Pharm Pharmaceut Sci**, v.11, n.3, p.30-34, 2008.

URAMOTO, K. M. et al. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. **Arthritis Rheum**, v.42, p.46-50, 1999.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biolog**, v.39, p.44–84, 2007.

VAN BAVEL, C.C et al. Glomerular targets of nephritogenic autoantibodies in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v.58, p.1892-1899, 2008.

VARGAS, K.S; ROMANO, M.A. Lúpus eritematoso sistêmico: aspectos epidemiológicos e diagnóstico. **Revista Salus-Guarapuava (PR)**. Jan.-Jun. 2009; 3(1).

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

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

WANCHU, A. et al. Serum and urine nitrite and citrulline levels among patients with systemic lupus erythematosus: a possible addition to activity parameters? **J Clin Rheum**, v.7, p.10-16, 2001.

WEINBERG, J.B. et al. The role of nitric oxide in the pathogenesis of spontaneous murine autoimmune disease: increased nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in MRL-lpr/lpr mice, and reduction of spontaneous glomerulonephritis and arthritis by orally administered NG-monomethyl-L-arginine. **J Exp Med**, v.179, p.651–60, 1994.

WIGAND, R. et al. Increased serum NG-hydroxy-L-arginine in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus as an index of an increased nitric oxide synthase activity. **Ann Rheum Dis**, v.56, p.330-332, 1997

WINFIELD, J.B; FAIFERMAN, I.; KOFFLER D. Avidity of anti-dsDNA antibodies in serum and IgG glomerular eluates from patients with systemic lupus erythematosus. Association of high avidity anti-native DNA antibody with glomerulonephritis. **J Clin Invest**, n. 59, p.90-96, 1977.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney Int**.v.49, p.1304-1313, 1996.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **J. Immunol**, v.16, p. 2524-2532, 1998.

YAP, D.Y.H; LAI, K.N. Pathogenesis of Renal Disease in Systemic Lupus Erythematosus — The Role of Autoantibodies and Lymphocytes Subset Abnormalities. **Int. J. Mol. Sci**, v.16, p.7917-7931, 2015.

YUNG, S. et al. Mediators of Inflammation and Their Effect on Resident Renal Cells: Implications in Lupus Nephritis. **Clinical and Developmental Immunology**, v.2013, p.1-10, 2013.

YUNG, S.; CHAN T.M. “Anti-DNA antibodies in the pathogenesis of lupus nephritis—the emerging mechanisms,” **Autoimmunity Reviews**, v.7, n.4, p. 317–321, 2008.

YUNG, S.; CHAN T.M. Autoantibodies and Resident Renal Cells in the Pathogenesis of Lupus Nephritis: Getting to Know the Unknown. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p 1-13, 2012.

ZIVKOVIC, V. et al. Anti-dsDNA, anti-nucleosome and anti-C1q antibodies as disease activity markers in patients with systemic lupus erythematosus. **Srp Arh Celok Lek**. n.142, v.7-8, p.431-436, 2014.

ZHANG, Q. et al. Oxidative protein damage and antioxidant status in systemic lupus erythematosus. **Clin Exp Dermatol.**, v.35, n.3, p.287-294, 2010.

## **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 nefrite lúpica.

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

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar: **Professora Dra. Andrea Name Colado Simão, no Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do HU/UEL, fone 43-3371-2321, e-mail: [deianame@yahoo.com.br](mailto: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:
<p>MEDICAMENTOS</p> <p>PREDNISONA:          HIDROXICLOROQUINA/CLOROQUINA:          METOTREXATE:          AZATIOPRINA:          MICOFENOLATO MOFETIL:          OUTROS IMUNOSSUPRESSORES:          OUTROS:</p>	
<p>OUTRAS DOENÇAS:</p> <p>HAS SIM ( ) NÃO ( )          DIABETES SIM ( ) NÃO ( )          AVC/IAM SIM ( ) NÃO ( )          OUTROS:</p>	
<p>NEFRITE LÚPICA</p> <p>SIM ( ) NÃO ( )          OBS:</p>	
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 <sup>3</sup> .
1	Leukopenia	<3,000 white blood cells/mm <sup>3</sup> . 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

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



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

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

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

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

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todas as pendências foram respondidas adequadamente.

**Recomendações:**

Encaminhar relatório ao final do estudo.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Prezada Pesquisadora,

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

Endereço: AVENIDA ROBERT KOCH, 60

Bairro: VILA OPERÁRIA

UF: PR Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-2490

CEP: 86.038-440

E-mail: cep268@uel.br

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



LONDRINA, 04 de Março de 2013

---

**Assinador por:**  
**Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli**  
**(Coordenador)**

## ANEXO C

## Instruções para autores da revista Immunobiology

**IMMUNOBIOLOGY****AUTHOR INFORMATION PACK****TABLE OF CONTENTS**

•	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Audience</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Impact Factor</b>	<b>p.1</b>
•	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
•	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
•	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.3</b>



ISSN: 0171-2985

**DESCRIPTION**

**Immunobiology** is a monthly published journal that strongly encourages the fast publication and dissemination of highly innovative research approaches for a wide range of immunological subjects, including

- **Innate Immunity,**
- **Adaptive Immunity,**
- **Complement Biology,**
- **Macrophage and Dendritic Cell Biology,**
- **Parasite Immunology,**
- **Tumour Immunology,**
- **Clinical Immunology,**
- **Immunogenetics,**
- **Immunotherapy** and
- **Immunopathology of infectious, allergic and autoimmune disease.**

Following its history as the first ever published Specialist Immunology Journal, founded in 1909, **Immunobiology** follows its mission to form a vital link between scientists and clinicians by offering a fast track line for high priority publications to speed up communication amongst immunologists all over the world. In the best of spirits, **Immunobiology** aims to continue the tradition set by its founding members and supporters, including such distinguished scientists as Paul Ehrlich, Hans Sachs, Carl Oluf Jensen, Sibasaburo Kitasato, Karl Landsteiner, Max Neisser and many others.

The journal publishes original research articles, short communications, reviews, commentaries and letters to the editors. In addition the journal publishes Special Issues to widely cover specific research themes within the field of Immunology and proceedings of Immunological Societies.

**AUDIENCE**

Immunologists, bacteriologists, virologists, serologists, biochemists, dermatologists, researchers into infectious diseases, hematologists, allergists, histochemists, pathologists

**IMPACT FACTOR**

2014: 3.044 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

Animal Breeding Abstracts  
 Biosciences Information Services  
 Elsevier BIOBASE  
 Cambridge Scientific Abstracts  
 Current Contents/Life Sciences  
 MEDLINE®  
 Index Veterinarius  
 Medical Documentation Service  
 EMBASE  
 Reference Update  
 Research Alert  
 Science Citation Index  
 Scisearch  
 Veterinary Bulletin  
 Excerpta Medica  
 Biological Abstracts  
 Current Awareness in Biological Sciences  
 CAB Abstracts  
 Chemical Abstracts Service  
 Scopus  
 Current Advances in Genetics and Molecular Biology

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

**Wilhelm J. Schwaeble**, Dept. of Infection, Immunity and Inflammation, University of Leicester, Leicester, LE: 9HN, England, UK, Medical Science Bld, University Road, Fax: ++44-116-2525030

### *Editorial Coordinator*

**Leyla Z. Al-Mansouri**

### *Section Editors*

**Basel al-Ramadi**, United Arab Emirates (UAE) University, Al Ain, United Arab Emirates

**Olaf Groß**, Technische Universität München, Munich, Germany

**Julia Kzhyskowska**, University of Heidelberg, Mannheim, Germany

**John Lambris**, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, USA

**Galina Mukamolova**, University of Leicester, Leicester, England, UK

**Peter Zavodsky**, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

### *Editorial Board*

**Youssif Mohammed Ali**, University of Leicester, Leicester, England, UK

**Gérard J. Arlaud**, Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire, Grenoble Cedex, France

**John Atkinson**, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA

**Marina Botto**, Royal Postgrad. Medical School, London, UK

**Arturo Ferreira**, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile

**Teizo Fujita**, Fukushima Medical University, Fukushima, Japan

**Diethard Gerns**, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany

**Uffe Holmskov**, Syddansk Universitet, Odense C, Denmark

**Roger James**, University of Leicester, Leicester, England, UK

**Stefan Kaufmann**, Max Planck Institut (MPI) für Infektionsbiologie, Berlin, Germany

**Daniela N Maennel**, University of Regensburg, Regensburg, Germany

**Patrice Noël Marche**, Université Joseph Fourier (Grenoble I), Grenoble Cedex 09, France

**Misao Matsushita**, Tokai University, Kanagawa, Japan

**Kenneth B.M Reid**, University of Oxford, Oxford, UK

**Noel Rose**, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA

**Robert B Sim**, MRC Immunochemistry Unit, Oxford, UK

**Silvano Sozzani**, Università degli Studi di Brescia, Brescia, Italy

**Gregory L. Stahl**, USA Harvard Medical School, Boston, Maine, USA

**Marcus Thelen**, Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona, Switzerland

**Russell Wallis**, University of Leicester, Leicester, England, UK

**Marsha Wills-Karp**, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA

## PREPARATION

### NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

### References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

### Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

#### *Figures and tables embedded in text*

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

#### *Subdivision - unnumbered sections*

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 7 keywords by avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

#### Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

### References

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

### **AFTER ACCEPTANCE**

#### *Availability of accepted article*

This journal makes articles available online as soon as possible after acceptance. This concerns the accepted article (both in HTML and PDF format), which has not yet been copyedited, typeset or proofread. A Digital Object Identifier (DOI) is allocated, thereby making it fully citable and searchable by title, author name(s) and the full text. The article's PDF also carries a disclaimer stating that it is an unedited article. Subsequent production stages will simply replace this version.

## ANEXO D

## Comprovante de submissão de artigo.

Dear Dr. Nicole Stadtlober Stadtlober,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Immunobiology

Corresponding Author: Andréa Simão

Co-Authors: Nicole Stadtlober P Stadtlober, MSc; Tatiana Mayumi Iriyoda V Iriyoda, MSc; Francieli Delongui, PhD; Beatriz S Sabino; Marcell Alysson B Lozovoy, PhD; Neide T Costa, MSc; Edna Maria V Reiche, PhD; Isaias Dichi, PhD;

Title: Oxidative And Nitrosative Stress And Autoantibodies Are Associated With Lupus Nephritis.

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at [deianame@yahoo.com.br](mailto:deianame@yahoo.com.br); do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<http://ees.elsevier.com/imbio/l.asp?i=17171&l=AK5QOZR4>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/2210/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923)

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Immunobiology